FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1933 N. 19

THÈSE présentée pour le DOCTORAT en médecine

par

NICOLESCO Georges Métodius

né le 3 Juillet 1905

à Ceacou Valea-Plopoului (Roumanie)

Etude critique expérimentale sur les méthodes d'identification du sang en médecine légale

Président: M. P. CHAVIGNY, Professeur

Les Editions Universitaires de Strasbourg
1a, Place de l'Université * Quai du Maire Dietrich 1
STRASBOURG
R. C. Strasbourg 3677
1933

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

ANNÉE 1933 N.....19

THÈSE présentée pour le DOCTORAT en médecine

par

NICOLESCO Georges Métodius

né le 3 Juillet 1905

à Ceacou Valea-Plopoului (Roumanie)

Etude critique expérimentale sur les méthodes d'identification du sang en médecine légale

Président: M. P. CHAVIGNY, Professeur

Les Editions Universitaires de Strasbourg
1a, Place de l'Université * Quai du Maire Dietrich 1
STRASBOURG
R. C. Strasbourg 3677
1933

FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

Doyen	MM.	MERKLEN ✲ ⁂ I.
Assesseur		NICLOUX ✲ ⁂ I.

Professeurs

Embryologie	MM.	ANCEL ✲ ⁂ I.
Anatomie		FORSTER ✲ ⁂ I.
Histologie		BOUIN O. ✲ ⁂ I.
Physiologie		SCHAEFFER ⁂ I.
Physique biologique		VLES ✲ ⁂ I.
Chimie biologique		NICLOUX ✲ ⁂ I.
Anatomie pathologique		MASSON ✲ ⁂ I.
Pharmacologie, Médecine expérimentale		SCHWARTZ ⁂ I.
Hygiène, Bactériologie		BORREL C. ✲ ⁂ I.
Médecine légale		CHAVIGNY C. ✲ ⁂ I
Clinique médicale		MERKLEN ✲ ⁂ I.
		AMBARD ✲ ⁂ I.
Clinique chirurgicale		SORREL ✲ ⁂ I.
		STOLZ ✲ ⁂ I.
Clinique ophtalmologique		WEILL ⁂ I.
Clinique dermatologique		PAUTRIER O. ✲ ⁂ I.
Clinique psychiatrique		PFERSDORFF ✲ ⁂ I.
Clinique neurologique		BARRE ✲ ⁂ I.
Clinique gynécologique et accouchements		REEB ⁂ I.
Clinique infantile		ROHMER ✲ ⁂ I.
Clinique oto-rhino-laryngologique		CANUYT ✲ ⁂ I.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		BLUM (Paul) O. ✲ ⁂ I.

Professeurs sans chaire :

MM. ARON Max ⁂ I.
BELLOCQ ⁂ I.
GERY ⁂ I.
MM. FONTES ⁂ A.

Chargés de cours et Agrégés :

MM. BENOIT ⁂ A.
GELMA ⁂ I.
GUNSETT ✲ ⁂ A.
HANNS ✲ ⁂ A.
HUMBERT ✲ ⁂ A.
KAYSER
KELLER ⁂ I.
MM. KREIS ⁂ A.
LARROUSSE ⁂ A.
REISS
SIMON ✲ ⁂ A.
SIMONIN ✲ ⁂ A
VAUCHER ✲ ⁂ A.
WEISS A.

Chargés d'un cours complémentaire :

MM. A. BOECKEL ✲ ⁂ A., MEYER M. ⁂ A., ROEDERER

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Serment d'Hippocrate.

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Être suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE,

A MON PÈRE,

A MES FRÈRES ET SŒURS,

A MON FÈRE CONSTANTIN

en témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL CHAVIGNY,

Directeur de l'Institut de Médecine légale
Médecin Général de l'armée
Commandeur de la Légion d'Honneur

Hommage de ma respectueuse admiration.

A MONSIEUR LE DOCTEUR SIMONIN,

Professeur agrégé de Médecine Légale
Chevalier de la Légion d'Honneur

qui m'a inspiré le sujet de la présente thèse, et a bien voulu me guider au cours de mon travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

ET DES HOPITAUX DE STRASBOURG

INTRODUCTION.

La question de l'identification du sang constitue un chapitre des plus importants de la médecine légale. Les méthodes vraiment scientifiques pour caractériser le sang, ne datent pourtant pas de bien longtemps. Du temps de Fourcroy, Barruel et autres, on indentifiait les taches de sang par l'odorat ou par les craquelures qu'elles présentaient par dessication. Depuis, un grand nombre d'auteurs se sont appliqués à rechercher des méthodes scientifiques capables de donner des résultats rigoureux et utilisables devant les tribunaux. C'est ainsi que les techniques et les procédés proposés se sont multipliés.

Devant le grand nombre de ces méthodes, dont beaucoup n'ont pas encore eu le temps de faire leurs preuves et parmi lesquelles il s'en trouve qui présentent une réelle valeur, le médecin légiste est embarrassé du choix, lorsqu'il veut s'adresser à la technique présentant le plus de garantie et bien adaptée à chaque cas particulier. L'absence d'une étude expérimentale comparative nous a semblé une raison assez importante pour justifier un travail sur ce sujet.

Notre thèse aura donc pour objet l'étude critique expérimentale des principales méthodes d'identification du sang en médecine légale.

Une première classification s'impose en considérant comme critérium la valeur réelle de chacune des méthodes préconisées. C'est ainsi que nous distinguons trois groupes de réactions, réparties sous la rubrique suivante :

I. Réactions d'orientation.
II. Réactions de probabilité.
III. Réactions de certitude.

Nous ne nous attarderons pas aux réactions d'orientation qui sont bien connues et dont la valeur est très faible. Rappelons seulement qu'elles reposent à la fois sur l'étude de l'aspect, de la coloration des taches de sang et de la propriété qu'elles possèdent de donner naissance à de fines bulles gazeuses en présence d'eau oxygénée et d'hypobromite.

Les réactions de probabilité comme leur nom l'indique, méritent qu'on s'y attarde davantage, d'autant plus qu'elles sont nombreuses et que certains auteurs leur accordent plus d'importance qu'elles n'en présentent.

Enfin nous consacrerons l'objet de notre dernier chapitre à l'étude des réactions de certitude qui doivent être très bien connues des médecins légistes.

PREMIÈRE PARTIE.

RÉACTIONS DE PROBABILITÉ.

Les réactions de probabilité dans l'identification du sang, en médecine légale, sont des méthodes colorantes simples, rapides et d'une grande sensibilité. Elles ont une valeur certaine par leurs résultats négatifs et une valeur seulement probable par leurs résultats positifs.

Les méthodes colorantes préconisées pour l'identification du sang en médecine légale sont nombreuses et de valeur inégale. Beaucoup parmi elles ne sont que très rarement employées.

Nous étudierons les principales de ces méthodes, les plus usitées, comme la réaction *à la teinture de gaïac, à la phénolphtaléïne, à la benzidine* et *au leuco-vert-malachite*.

Principe général des méthodes colorantes.

Toutes les méthodes chimiques colorantes reposent sur le même principe, basé sur les propriétés oxydasiques du sang. Grâce à un ferment spécial qu'il contient et qu'on appelle aussi péroxydase ou élément transport-oxygène, le sang a une double propriété; premièrement, de décomposer les péroxydes ou corps fortement oxygénés comme l'essence de térébenthine ou l'eau oxygénée, mettant en liberté l'oxygène naissant; deuxièmement, de catalyser toute oxydation susceptible de se produire pendant cette décomposition du péroxyde.

Le sang à lui seul n'oxyde pas. Il accélère une oxydation, la rend possible, il joue le rôle d'un catalyseur.

L'essence de térébenthine ozonisée ou l'eau oxygénée qu'on appelle des péroxydes, ne peuvent pas non plus fournir l'oxydation en dehors de la présence du sang. Par conséquent, pour que la réaction soit possible, il faut qu'il y ait réunion de trois éléments, à savoir :

1°) Une substance, qui par oxydation donne naissance à une matière colorante.

2°) Un péroxyde, tel que l'eau oxygénée ou l'essence de térébenthine, qui apporte l'oxygène nécessaire à la réaction.

3°) Une péroxydase, qui par sa présence, rend l'oxydation possible.

La réaction générale peut se schématiser de la manière suivante :

Matière colorante + Péroxydase + Péroxyde = Coloration
réduite (sang) (e.oxy.)

Nous avons dit que le sang est une des meilleures péroxydases connues, mais elle n'est pas la seule, c'est ce qui fait comprendre que ces réactions colorantes du sang manquent de spécificité. Appliquées à l'identification du sang, la formule précédente devient :

Matière colorante réduite + Solut. X + Péroxyde
= Coloration ou absence de coloration.

La solution X représente la dissolution de la tache à identifier. La réaction est positive, c'est-à-dire, s'il y a coloration, cela voudra dire que la solution X contient une péroxydase et permettra de répondre que la tache est probablement constituée par du sang. Si la réaction est négative, on pourra conclure que la tache ne contient pas de sang.

Les substances se colorant par oxydation sont nombreuses. Elles ne peuvent pas toutes servir de réactifs colorants. Le grand nombre de ces substances explique la multitude de réactifs proposés. Les uns de ces réactifs sont des matières colorantes soumises à l'action des réducteurs, en particulier à celle de l'hydrogène naissant qui les transforme en corps incolores, susceptibles de régénérer par une réoxydation dans les conditions que nous

avons décrites plus haut, la couleur originelle. D'autres, ce sont des matières non colorées à l'état habituel, qui, soumises à une oxydation en présence du sang, prennent une coloration spéciale. Que ce soit oxydation pour les substances non colorées, ou réoxydation pour les substances colorantes réduites, donc préalablement décolorées, c'est toujours le même phénomène d'oxydation se manifestant par un changement de coloration qui est à la base de toutes ces réactions colorantes. Mais l'oxydation ne présente pas pour toutes les substances susceptibles de se colorer la même facilité. Ce point de vue va guider le choix des réactifs colorants. Les unes se recolorent très vite au contact de l'air, ou instantanément sous l'action d'un péroxyde. Celles-ci ne peuvent être, naturellement, d'aucune utilité dans l'identification de la péroxydase. Dans un deuxième groupe, entrent des substances qui s'oxydent très lentement à l'air, mais très rapidement sous l'action d'une péroxydase. Enfin, dans un troisième groupe entrent des substances ne s'oxydant pas du tout dans ces mêmes conditions. Ce sont les substances colorantes appartenant à ces deux derniers groupes, qui peuvent servir de réactifs dans l'identification du sang.

Lorsqu'une des substances colorantes, appartenant à un de ces deux groupes derniers, se trouve à la fois en présence d'une péroxydase et d'un péroxyde, la réaction d'oxydation, catalysée par le ferment, devient beaucoup plus rapide si la substance colorante appartient au deuxième groupe; elle devient seulement possible, si la substance colorante appartient au troisième groupe. Ainsi la rapidité de la première réaction, la possibilité de la seconde, démontrent dans les deux cas l'existence d'une péroxydase, donc du sang qui la contient, ou tout au moins d'un corps ayant les propriétés de la péroxydase.

Donc, les réactions chimiques colorantes s'appliquent à la mise en évidence d'une péroxydase ou d'une oxydase quelle qu'elle soit et rien de plus. Leur emploi dans la recherche du sang, qui n'est qu'une des nombreuses matières organiques contenant des oxydases, n'est que l'application dans un cas particulier, d'un principe général.

De nombreux sels minéraux également peuvent jouer le rôle des oxydases et donner des réactions colorantes positives, en l'absence complète de sang.

En raison même de leur principe de base, les réactions chimiques colorantes ne peuvent pas être spécifiques du sang, et c'est pourquoi nous ne les appelons que réactions de probabilité. Cependant en suivant certains détails opératoires, des causes d'erreur fréquentes sont évitées et les réactions gagnent une valeur qui, sans être rigoureusement spécifique, est très importante.

Il s'agit donc pour nous de rechercher quels sont les meilleurs réactifs utilisables en médecine légale. Un tel réactif doit posséder un certain nombre de qualités qui sont:

1°) la plus grande spécificité pour le sang. Nous nous sommes déjà expliqués sur ce point.

2°) la sensibilité qui cependant ne saurait être excessive sans devenir gênante;

3°) la préparation simple du réactif;

4°) la longue conservation du réactif;

5°) le mode d'emploi facile du réactif, soit vis-à-vis du sang desséché, soit vis-à-vis d'une dissolution d'une tache de sang, soit sur le support même de cette tache.

Précautions à prendre dans la technique des méthodes colorantes.

Il y a lieu de rappeler ici, qu'avant de pratiquer la réaction, il est indispensable d'éprouver les réactifs. Cette épreuve comporte quatre essais. Dans quatre verres de montre, on fait les mélanges suivants:

— *Premier* — 1 goutte de réactif + 1 goutte d'eau oxygénée ou d'essence de térébenthine = négative.

— *Deuxième* — 1 goutte de réactif + 1 goutte de sang dilué = négative.

— *Troisième* — 1 goutte de sang dilué + 1 goutte d'eau oxygénée ou d'essence de térébenthine = négative.

— *Quatrième* — 1 goutte de réactif + 1 goutte de sang dilué + 1 goutte d'eau oxygénée ou d'essence de térébenthine = positive. La coloration spécifique de la réaction ne doit apparaître que dans ce dernier verre de montre.

En ce qui concerne l'eau oxygénée, une cause d'erreur fréquente vient de ce qu'on utilise de l'eau oxygénée déjà ancienne, qui a perdu son pouvoir oxydant et donne même en présence du sang une réaction négative.

I.

Réaction a la teinture de gaiac ou de Van Deen.

La réaction à la teinture de gaïac fut étudiée pour la première fois et appliquée à l'identification du sang par un médecin hollandais du nom de Van Deen ,en 1861. Elle est une des plus anciennes méthodes colorantes dans l'identification des taches de sang, sinon la plus ancienne. Plus tard la méthode fut reprise et étudiée par Liman et en 1871, Taylor la fit entrer dans la médecine légale, où il en fit un moyen d'investigation important dans l'identification des taches de sang, par les empreintes qui portent son nom.

La réaction de Van Deen n'eut pas toujours la même valeur, car, des nombreuses modifications ayant été tentées, les unes sont arrivées à lui augmenter la spécificité. D'après certains médecins légistes et parmi eux citons Vibert, la méthode de Van Deen est la meilleure méthode colorante dans l'identification du sang; d'après d'autres, elle cède le pas à d'autres méthodes colorantes estimées supérieures.

Préparation du réactif de Van Deen.

La substance qui fournira la couleur par oxydation, est constituée par la teinture fraiche de résine de gaïac. On prend quelques fragments de résine au centre d'un morceau plus volumineux et récemment cassé. Il faut rejeter les parties vertes superficielles déjà oxydées, qui recouvrent la résine de gaïac.

Résine de gaïac..... 5 gr.
Alcool à 95°..... 100 cm³.

Après la dissolution qui est rapide, on filtre et on obtient un liquide de couleur jaune-brun. La réaction nécessite encore soit de l'eau oxygénée du commerce à 12 volumes, soit de l'essence de térébenthine ozonisée. Nous préférons, par expérience, l'eau oxygénée à l'essence de térébenthine, ayant toujours obtenu des résultats meilleurs avec l'eau oxygénée. En présence du sang et de l'eau oxygénée le réactif à la teinture de gaïac donne une coloration bleue.

Conservation du réactif.

La teinture de gaïac constitue un réactif assez stable, et d'après certains auteurs, il se conserve des mois, si on prend la précaution de le mettre dans un flacon bien bouché. Nous nous sommes servi d'un réactif préparé quelques semaines auparavant et nous avons trouvé sa conservation très bonne.

Sensibilité du réactif.

La réaction de Van Deen est très sensible. On admet généralement que sa sensibilité remonte jusqu'à une solution de sang à 1/20.000. Selon Otto Leers, elle donne encore une réaction positive avec une solution à 1/25.000.

Toutefois, si cette grande sensibilité existe en présence du sang frais, par contre, elle est diminuée en présence du sang modifié par le vieillissement et surtout par la putréfaction. Si la putréfaction s'accentue, après une dizaine de jours, les résultats sont positifs jusqu'à un millième seulement. Mais si nous avons constaté que la sensibilité de la réaction diminue par la putréfaction du sang, nous n'avons pas pu constater son inefficacité complète en présence du sang vieux, comme on l'affirme parfois. Nous avons obtenu des réactions positives avec des taches de sang sur du papier buvard et sur du linge blanc datant de six, sept et huit ans. Il est vrai que ces réactions n'ont pas été d'une promptitude pareille à celles qu'on aurait obtenues en présence du sang frais;

aussi la coloration bleue était-elle plus atténuée, comme pour de très faibles dilutions de sang frais. Ces réactions positives, nous les avons obtenues en dissolvant préalablement les taches dans l'ammoniaque ou l'acide acétique glacial, mais aussi en appliquant le réactif directement sur la tache. Dans ce dernier cas, la réaction demandait presque une minute pour se produire.

Ces expériences nous font conclure que la sensibilité de la réaction diminue par la putréfaction ou le vieillissement du sang, mais qu'elle subsiste néanmoins, à la condition que la dilution du sang ne soit pas trop grande.

La réaction est positive avec du sang porté longtemps à l'ébullition. Nous avons fait bouillir du sang jusqu'à évaporation presque complète. Nous avons obtenu une masse solide, noirâtre, que nous avons dissoute dans de l'ammoniaque. Après évaporation complète de l'ammoniaque, nous avons obtenu une réaction positive. Donc, le sang porté longtemps à une haute température, donne encore une réaction positive au gaïac.

Technique de la réaction de VAN DEEN.

Essai du réactif.

Il est important d'éprouver au préalable le réactif employé, comme nous l'avons déjà dit. Pendant l'essai du réactif, si on obtient uniquement dans le quatrième verre de montre une coloration bleue immédiate, devenant de plus en plus intense, le réactif peut être employé pour la réaction.

Pratique de la réaction.

Dans un verre de montre posé sur un fond blanc, un papier blanc par exemple, pour mieux faire ressortir tout changement de coloration, on met deux ou trois gouttes de la solution aqueuse à examiner. On ajoute la même quantité de teinture de gaïac; on regarde s'il ne se produit pas de modification de coloration; puis on verse une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes.

En présence du sang, spontanément ou rapidement, suivant l'état du sang, une coloration apparaît. Cette coloration peut va-

rier du bleu au bleu-vert sale, selon la qualité de la teinture de gaïac. Elle est due à l'oxydation de l'acide gaïaconique, contenu dans la teinture de gaïac.

La réaction n'a de valeur que si elle se produit rapidement, après quelques secondes ou après une minute au plus. En présence du sang, la coloration est homogène, elle se répand simultanément dans toute la préparation.

Pour que la réaction ait toute sa valeur, il est important d'ajouter d'abord la teinture de gaïac, l'eau oxygénée ou l'essence de térébenthine ensuite, comme nous l'avons déjà exposé. Nous préférons l'eau oxygénée à 12 volumes à l'essence de térébenthine, l'ayant trouvée plus efficace. La teinture de gaïac sans la présence de l'eau oxygénée, ne bleuit pas par le sang, mais bleuit par diverses autres substances et particulièrement rapidement par certaines substances minérales; donc le bleuissement de la teinture sans la présence de l'eau oxygénée, est un indice probable que la substance examinée n'est pas du sang. Cet indice ne peut pas être certain, car il se pourrait que dans la solution à examiner se trouve également du sang en même temps qu'une de ces substances minérales Dans ce cas on doit continuer la recherche du sang, par d'autres moyens plus spécifiques.

Pour augmenter la spécificité de la réaction, nous nous sommes assurés qu'il est utile d'ajouter à la solution à examiner, avant l'addition du réactif, quelques gouttes d'acide acétique glacial, qui a la propriété d'empêcher les substances organiques, autres que le sang, de provoquer une réaction positive. En effet, les oxydases, à l'exception de la péroxydase du sang, ne provoquent pas la réaction en milieu acide. De même, nous avons contrôlé que l'ébullition de la solution pendant quelques instants suffit à éliminer l'action des oxydases, autres que celle du sang, ayant pour effet de détruire toute autre diastase, excepté la péroxydase du sang. Ces deux procédés se valent l'un l'autre, mais l'emploi de l'acide acétique glacial est beaucoup plus commode, tandis que l'ébullition n'est pas toujours possible.

On peut également pratiquer la réaction de VAN DEEN directement sur une tache, sans la faire dissoudre au préalable. Mais cette manière de faire n'est pas toujours possible, soit parce que la tache étant minime et unique, on juge nécessaire de la conserver pour des recherches ultérieures (on fait dans ce cas des empreintes de Taylor), soit parce que les taches étant trop vieilles et mal conservées, on craint que la réaction n'aboutisse à un résultat insuffisamment net, à cause d'une dissolution insuffisante. Ceci nous entraîne à dire un mot sur les dissolvants des taches de sang.

L'ammoniaque dissout très bien les vieilles taches de sang. Etant volatil, l'ammoniaque quitte complètement la solution. A lui seul, il ne donne pas de réaction positive à la teinture de gaïac, il ne peut, par conséquent, pas constituer une cause d'erreur de la réaction.

Avec la rouille également, nous n'avons pas pu obtenir de réaction positive, contrairement aux constatations de certains auteurs. Mais il n'en est pas toujours ainsi, car d'autres réactions de probabilité peuvent être positives avec la rouille. Or, l'ammoniaque a l'avantage de ne pas dissoudre la rouille. De même, il ne dissout pas l'indigo, ni la plupart des teintures d'aniline, qui peuvent avec certaines réactions de probabilité donner des résultats positifs.

Ainsi, en présence des taches suspectes, reposant sur des objets métalliques couverts de rouille, ou reposant sur des étoffes colorées à l'indigo ou à l'aniline, on n'a qu'à gratter ces taches au-dessus d'un godet contenant de l'ammoniaque pur. S'il y a du sang, il sera rapidement dissous; la rouille, ainsi que les matières colorantes citées, resteront insolubles. On n'a alors qu'à décanter ou filtrer, pour obtenir une solution de sang parfaitement claire. En laissant l'ammoniaque se volatiliser, il reste une solution aqueuse prête à examiner.

Nous avons constaté également qu'il est possible de faire des empreintes de Taylor avec du papier buvard imprégné d'ammoniaque pur, et d'obtenir un résultat positif. Cette technique très sen-

sible est à recommander lorsqu'il s'agit de déceler du sang mélangé à de la rouille, reposant sur des objets métalliques.

En ce qui concerne la réaction à la teinture de gaïac, nous préférons comme dissolvant l'acide acétique glacial, lequel, tout en étant un bon dissolvant des taches de sang, a aussi l'avantage, que nous avons déjà signalé, d'empêcher les oxydases, autres que la péroxydase du sang de provoquer une réaction positive. Il augmente donc la spécificité de la réaction, en même temps qu'il peut servir comme bon dissolvant des taches de sang.

Pour l'emploi du procédé des empreintes de Taylor, il est nécessaire d'essayer auparavant le papier buvard qu'on utilise, car souvent ces papiers buvards bleuissent la teinture de gaïac, en dehors de la présence du sang. Pour obtenir ces empreintes, on mouille le papier buvard avec de l'eau distillée et on l'applique sur les taches suspectes avec une pression légère. Au bout de quelques minutes, on enlève le papier buvard et on verse alors sur la surface qui a été en contact avec la tache, quelques gouttes de teinture de gaïac, puis, quelques gouttes d'eau oxygénée. Si on est en présence de sang, des taches bleues apparaîssent rapidement, épousant la forme des taches de sang.

Pour faire des empreintes de Taylor sur des couteaux, il est pratique, après avoir enveloppé la lame de couteau dans un papier buvard mouillé, de mettre deux lames de verre porte-objets sur les deux faces de la lame de couteau, et de les fixer par des pinces à linge qui exerceront en même temps une certaine pression.

Causes d'erreur de la réaction et les moyens pour les combattre.

Les causes d'erreur de la réaction sont nombreuses, car les produits qui provoquent l'apparition de la coloration bleue en présence du gaïac, sont également nombreux. Ces produits sont organiques ou chimiques. Mais on peut éliminer une partie de ces causes d'erreur en tenant compte : que certaines de ces substances provoquent la coloration bleue sans l'intervention du corps ozo-

nisé ; que les oxydases, sauf la péroxydase, sont détruites par l'ébullition ou sont empêchées par l'addition d'acide acétique glacial.

Un autre moyen d'élimination des causes d'erreur de la réaction, est de tenir compte du laps de temps nécessaire à la réaction pour devenir positive. Toute coloration bleue ou bleu-verte apparaîssant après un temps plus long qu'une minute, ne doit pas compter pour une réaction positive. Ces moyens de combattre les causes d'erreur de la réaction sont très faciles à appliquer, ils ne compliquent pas la réaction de Van Deen, dont la première qualité est d'être une réaction d'un emploi facile, expéditif, mais ils sont incapables d'éliminer toutes les causes d'erreur.

Les quelques expériences qui suivent montrent les grands services que ces moyens rendent pourtant à la réaction, elles montrent également la variabilité des substances capables de bleuir la teinture de gaïac.

Avec quelques substances réputées capables de produire des réactions positives, nous avons constamment eu des résultats négatifs. Ainsi avec l'urine, le sperme, le mucus vaginal, l'ammoniaque et la rouille, nous avons toujours obtenu des réactions négatives à la teinture de gaïac.

Substances organiques

La teinture de gaïac prend une coloration bleue aussi :

1°) *Avec la salive ;* l'apparition de la coloration bleue est tardive, elle exige plusieurs minutes pour se produire et apparaît d'abord en trainées minces et éparses ne se généralisant que très lentement. La coloration n'est donc pas homogène, comme cela se produit en présence du sang. La salive ne donne pas toujours de réaction positive et bien des fois nous n'avons pas pu obtenir, malgré de nombreux essais, aucune coloration. La salive desséchée sur papier buvard peut également donner une coloration bleue en présence du réactif.

En ajoutant quelques gouttes d'acide acétique glacial à la salive, la coloration ne se produit plus, pas même tardivement.

Les oxydases ne provoquent pas l'apparition de la réaction en milieu acide.

2°) *Avec le lait;* nous avons expérimenté avec du lait du commerce (pasteurisé). La coloration bleue est tardive (deux, trois, quatre minutes), n'est pas homogène, peu intense au commencement, elle devient de plus en plus intense par la suite. La réaction ne se produit pas avec du lait additionné d'acide acétique glacial ou avec du lait bouilli.

3°) *Avec la farine;* réaction rapide; coloration bleu-verte en cinq à dix secondes. Avec acide acétique glacial, plus de réaction. Avec de la farine bouillie, réaction négative.

4°) *Avec la pomme de terre;* la coloration est intense et instantanée. Un papier buvard appliqué quelques instants sur la surface de section d'une pomme de terre fraîchement coupée, donne également une réaction positive instantanée. En présence de quelques gouttes d'acide acétique glacial, la réaction est impossible. Il en est de même après l'ébullition.

5°) *Avec la feuille de scarole;* l'acide acétique glacial ainsi que l'ébullition empêchent la réaction.

6°) *Avec le raisin;* coloration bleu-verte après deux ou trois minutes. Action empêchante de l'acide acétique glacial et de l'ébullition.

7°) *Avec la pulpe de prune;* coloration bleue rapide qui apparaît par simple adjonction de teinture de gaïac. L'eau oxygénée ne fait qu'augmenter l'intensité. L'ébullition empêche la réaction.

La réaction à la teinture de gaïac est négative: avec le mucus vaginal, avec le sperme, avec le jus ou la pulpe de tomate, avec l'urine; (nous avons expérimenté cette dernière réaction de nombreuses fois et jamais nous n'avons obtenu un résultat positif). Le sperme additionné de teinture de gaïac ne donne qu'un précipité, que l'adjonction d'eau oxygénée ne colore pas.

Substances minérales.

1°) *La rouille de fer* = pas de coloration bleue. L'addition d'eau oxygénée ne change rien. Nous avons expérimenté de nombreuses fois cette réaction, jamais nous n'avons obtenu un résultat positif, contrairement aux affirmations de certains auteurs.

2°) *Le sulfate de fer :* La coloration bleue apparaît dès l'addition de la teinture de gaïac, avant d'avoir ajouté l'eau oxygénée.

3°) *Le perchlorure de fer :* Coloration bleue intense dès qu'on ajoute de la teinture de gaïac. Cette coloration bleue non persistante, disparaît rapidement et une coloration verte sale lui succède.

4°) *L'iodure de fer :* L'adjonction de l'eau oxygénée ne change en rien la coloration verte sale produite par la solution d'iodure de fer et la teinture de gaïac.

5°) *Le sulfate de cuivre :* Avec une solution assez concentrée de sulfate de cuivre, on obtient par la seule addition de la teinture de gaïac une coloration bleue foncée immédiate. Si la solution de sulfate de cuivre est assez faible pour que la teinte bleue de la solution ne soit plus visible, la simple adjonction de teinture de gaïac ne produit plus de coloration bleue, mais en ajoutant de l'eau oxygénée la réaction devient positive et on obtient une coloration bleue très rapidement. La coloration est d'un bleu intense très différent du bleu pâle de la solution de sulfate de cuivre.

6°) *La teinture d'iode :* En présence de la teinture de gaïac il se produit une coloration verte qui ne vire pas au bleu, même si on ajoute de l'eau oxygénée.

7°) *Le permanganate de potassium :* donne avec la teinture de gaïac seule, une coloration bleue intense instantanée. La réaction est identique avec du permanganate porté à l'ébullition.

8°) *L'ammoniaque :* avec la teinture de gaïac seule, donne une coloration jaune à reflets très faibles verdâtres, impossible à confondre avec la coloration bleue ou bleu-verte obtenue en présence du sang. L'addition de l'eau oxygénée ne change rien à la coloration jaune verdâtre.

De nombreuses modifications ont été apportées à la réaction de Van Deen, lesquelles compliquent plus ou moins la réaction.

La plus importante de ces modifications est celle de Weber (1). Mais la réaction de Weber n'élimine pas toutes les causes d'erreur. Nous avons obtenu en l'appliquant, des réactions positives, avec le sulfate de cuivre et le perchlorure de fer et il nous semble très probable que ces causes d'erreur ne sont pas les seules que la réaction de Weber ne puisse éliminer. D'autre part, la réaction de Weber, très employée en clinique, provoque une dilution de la solution à examiner, qui, dans certains cas, peut empêcher la réaction de se produire, malgré sa sensibilité; surtout quand on a à faire à une très petite quantité de sang modifié, pour lequel la sensibilité du réactif est diminuée. Ce dernier cas se rencontre assez fréquemment en médecine légale.

Valeur de la réaction.

La réaction de Van Deen n'est pas spécifique du sang. La spécificité est accrue par les moyens indiqués d'élimination des causes d'erreur.

La facilité et la rapidité avec laquelle on prépare le réactif, sa bonne conservation, sa sensibilité qui n'est jamais nulle, même en présence du sang modifié, la simplicité de la réaction en général, son interprétation facile, font de la réaction de Van Deen, qui est la plus ancienne des méthodes colorantes, une réaction de probabilité des plus simples et des plus expéditives.

Sa valeur positive est probable, mais sa valeur négative est certaine.

(1) Rappelons que la réaction de Weber consiste à ajouter à un volume de solution sanguine, un volume égal d'acide acétique gl. et autant d'éther.

II.

Réaction a la phénolphtalêine ou de Kastle-Meyer.

C'est en 1901 que Kastle et Scheede ont employé pour la première fois la réaction à la phénolphtaléine dans la recherche des oxydases. Ensuite Meyer étudia également ce réactif. Delearde et Benoit en 1911 indiquèrent ses applications, en médecine légale.

Principe de la réaction.

Le principe de la réaction est le suivant: La phtaléine du phénol, qui, en solution alcaline, vire au rouge, possède la propriété de se transformer, sous l'influence de l'hydrogène naissant, en un composé moins oxygéné, la phtaline du phénol ou phénolphtaline, qui ne se colore plus en rouge en milieu alcalin.

Par oxydation sous l'action de l'eau oxygénée et du sang, qui agit par son ferment spécial, dont nous avons déjà parlé et qu'on nomme également péroxydase, la phtaline du phénol redevient phtaléine du phénol, qui, se trouvant en présence d'alcali, donne une belle coloration rouge. Il s'agit donc d'une substance colorante, qui par réduction perd sa coloration, mais qui, en présence d'un péroxyde et sous l'action oxydasique spéciale du sang, se réoxyde et récupère en même temps sa coloration primitive.

Préparation du réactif.

La préparation du réactif consiste à mélanger dans un ballon de verre:

Phtaléine du phénol	2 gr.
Potasse anhydre	20 gr.
Eau distillée	100 gr.
Poudre de zinc	20 gr.

En raison de l'alcalinité du mélange, ce liquide est tout d'abord rouge. On mélange bien le tout et on porte à l'ébullition en

agitant sans cesse. Le liquide rouge se décolore peu à peu .Quand toute coloration rouge du liquide a disparu (ce qui indique que la réduction s'est accomplie sous l'action de l'hydrogène naissant, résultant de l'action de la potasse sur la poudre de zinc, et que la phénolphtaléine s'est transformée en phénolphtaline), on filtre à chaud : on obtient un liquide légèrement sirupeux de teinte claire : c'est le réactif de Meyer.

Le réactif doit être conservé à l'abri de l'air et de toute cause d'oxydation extérieure. Pour faciliter sa conservation, il est bon de mettre un peu de zinc au fond du flacon pour éviter l'oxydation, par l'hydrogène réducteur qui se dégage. Le péroxyde ou agent oxydant employé, est l'eau oxygénée à 12 volumes.

Conservation du réactif.

Ces précautions prises, le réactif se conserve assez bien. Nous avons expérimenté avec un réactif préparé des mois d'avance, et il s'est trouvé en très bon état et nullement inférieur en quoi que ce soit à un réactif fraîchement préparé, avec lequel nous l'avons comparé.

Sensibilité du réactif.

Le réactif de Meyer est extrêmement sensible. Nous avons obtenu des résultats positifs avec des solutions de sang au millionième. Balthazard et Lambert ont encore observé une réaction positive avec une dilution de sang au dix millionième. Nous n'avons pas pu constater une diminution notable de la sensibilité avec du sang putréfié et vieux, ainsi que nous l'avons noté avec la réaction de Van Deen.

Avec du sang putréfié et vieux nous avons eu des résultats positifs avec des dilutions à 1/300.000.

Nous avons obtenu des résultats nettement positifs, comme s'il s'était agi de sang frais, avec des taches de sang sur du linge blanc datant de cinq, six, sept et huit ans. Si la réaction paraîs-

sait plus lente à s'effectuer quand nous ajoutions le réactif directement sur la tache, ceci était dû à ce que la tache de sang mettait un certain temps pour se dissoudre. Mais si préalablement on fait dissoudre la tache de sang dans de l'ammoniaque pur, une ou deux minutes sont suffisantes pour avoir une coloration. Le sang menstruel et vieux donne une réaction positive.

La réaction est positive avec du sang porté longtemps à l'ébullition. Nous avons porté à l'ébullition du vieux sang putréfié, avec lequel, après refroidissement, nous avons eu des résultats très nets.

Avec de la viande bouillie, la réaction est également positive.

Le sang calciné donne une réaction négative.

Technique de la réaction de Kastle-Meyer.

Pour pratiquer la réaction, on met dans un verre de montre, posé sur un fond blanc de préférence, pour faire ressortir tout changement de coloration, quelques gouttes de la solution à examiner, on ajoute un volume égal du réactif, et on observe si aucune coloration nouvelle n'est apparue. Puis, on laisse tomber dans le mélange, une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes. En présence du sang, on voit apparaître immédiatement une belle coloration rouge vif. Pour que la réaction soit nettement positive, il faut que la coloration survienne instantanément. Si la réaction est lente à se produire, ou si elle est tardive, on ne doit en tirer aucune conclusion, car le réactif s'oxyde à l'air.

Il faut que la solution à examiner ne soit pas à une température supérieure à 30°, car le réactif pourrait dans ce cas s'oxyder en dehors de la présence du sang. Il faut également éviter que la solution à examiner soit trop fortement acide, ce qui empêcherait l'apparition de la coloration rouge, étant donné que la phénolphtaléine ne prend la coloration rouge qu'en milieu alcalin. C'est pourquoi, quand il s'agit de la réaction de Meyer, il ne faut pas employer pour dissoudre de vieilles taches, l'acide acétique glacial, mais l'ammoniaque, qui est cette fois le dissolvant de

choix, ne donnant à lui seul aucune coloration en présence du réactif de Meyer. Si toutefois on prend l'acide acétique glacial comme dissolvant des taches, il est absolument nécessaire de l'employer en très petite quantité, et une fois la dissolution terminée, de le diluer le plus possible.

Les quelques expériences qui suivent démontrent en quelles proportions l'acide acétique glacial est capable d'entraver la réaction de Meyer.

1 c.c. solut. sanguine 1/100 + 1 cc. ac. acét. gl. = Réact. négative
1 c.c. solut. sanguine 1/100 + 0,5 cc. ac. acét. gl. = Réact. négative
1 c.c. solut. sanguine 1/100 + 0,25 cc. ac. acét. gl. = Réact. négative
1 c.c. solut. sanguine 1/100 + 0,10 cc. ac. acét. gl. = Réact. négative
1 cc. solut. sanguine 1/100 + 0,05 cc. ac. acét. gl. = *Réact. positive*

Il suffit donc d'un dixième de cent. cube d'acide acétique glacial, ajouté à un cent. cube de solution sanguine au centième, pour entraver toute apparition de coloration rouge.

La réaction de Meyer est négative avec la rouille, les iodures de fer et un grand nombre de substances organiques, ce qui la rend sous ce dernier point beaucoup plus spécifique du sang que la méthode de Van Deen.

Elle est négative avec l'urine, le sperme, la salive, le lait pasteurisé, la farine, le pain, le glucose. Avec aucun de ces produits organiques nous n'avons obtenu une réaction nettement positive. Si, avec quelques-uns de ces produits, nous avons obtenu une faible coloration rose, elle est apparue trop lentement pour être une cause d'erreur. Nous avons également obtenu des réactions négatives avec la pomme de terre, l'épinard, le poireau, l'ail, l'oignon, de même avec des pétales de fleurs, avec le raisin, la pomme, etc...

Causes d'erreur de la réaction et les moyens pour les combattre.

Les causes d'erreur de la réaction de Meyer restent pourtant nombreuses. Mais le nombre des matières organiques susceptibles de donner une réaction positive, diminue sensiblement avec le ré-

actif de Meyer, par rapport à celui des substances organiques donnant coloration bleue avec le réactif de Van Deen. Par contre les substances minérales donnant coloration rouge avec le réactif de Meyer, restent nombreuses.

Pour combattre les causes d'erreur, on doit prendre quelques précautions et faire appel à quelques moyens, qui, sans les éliminer toutes, en évitent une grande partie.

1°) Il ne faut pas, comme nous l'avons déjà indiqué, opérer avec une solution ayant une température supérieure à 30°, car à cette température le réactif peut s'oxyder sans la présence de sang.

2°) Il ne faut pas employer pour la réaction de Meyer une solution de sang acide. Si le cas se présente, il faut au préalable, diminuer l'acidité par des dilutions. On emploiera comme dissolvant de vieilles taches de préférence l'ammoniaque, et non l'acide acétique.

3°) Il faut écarter tout résultat obtenu avant l'addition d'eau oxygénée. Si une solution donne une coloration rouge en présence du réactif, sans la présence de l'eau oxygénée, ceci est un indice probable qu'il ne s'agit pas de sang. L'indice est seulement probable, car il se peut qu'il se trouve également du sang dans la même solution.

4°) Il faut pour éliminer les oxydases, pouvant donner la même réaction que le sang, porter la solution à l'ébullition pendant quelques instants.

5°) Enfin, il ne faut pas prendre pour réaction positive une réaction lente ou tardive. Le réactif s'oxydant à l'air peut prendre à la longue une coloration rouge sans la présence de sang.

La réaction de Meyer est immédiate, elle n'admet aucun retard.

Nous avons essayé le réactif de Meyer sur différentes substances organiques et minérales, et nous n'avons pas constaté des causes d'erreur parmi les premières, mais les causes d'erreur nous ont semblé nombreuses parmi les substances minérales. Ces causes d'erreur sont difficilement évitables puisque l'ébullition est sans action.

Substances minérales.

1°) *Avec le sulfate de cuivre* = coloration rouge intense. En ajoutant à la solution de sulfate de cuivre, le réactif de Meyer, sans la présence de l'eau oxygénée, un précipité bleu intense se forme immédiatement. C'est donc un indice probable qu'il ne s'agit pas de sang. C'est en ajoutant l'eau oxygénée, qu'une coloration rouge très intense apparaît; ceci pour des solutions fortes de sulfate de cuivre. Mais si la solution est très diluée, il ne se forme plus de précipité bleu par simple adjonction du réactif. Seulement, la coloration rouge apparaît dès qu'on ajoute au mélange l'eau oxygénée.

2°) *Avec le cuivre métallique* = color. rouge intense, immédiate, persistante, homogène, prenant toute la préparation.

3°) *Avec le laiton* = color. rouge intense, immédiate, s'étendant à toute la préparation. La coloration n'apparaît qu'en présence du réactif et de l'eau oxygénée.

4°) *Avec le nickel* = coloration rouge.

5°) *Avec le sulfate de fer* = coloration rouge.

Le sulfate de fer en présence du réactif de Meyer et sans la présence de l'eau oxygénée, forme un précipité bleu abondant, indice probable qu'il ne s'agit pas de sang. Par l'addition de l'eau oxygénée, une coloration rouge-brun foncé apparaît immédiatement.

6°) *Avec le perchlorure de fer* = coloration rouge brun, apparaissant avant l'addition de l'eau oxygénée. Si on ajoute au mélange de perchlorure de fer et de réactif, de l'eau oxygénée, la coloration rouge devient plus intense.

7°) *Avec le ferrocyanure de potassium* = coloration rouge immédiate, sans la présence de l'eau oxygénée, ce qui élimine la cause d'erreur.

8°) *Avec le ferricyanure de potassium* = coloration rouge immédiate, sans la présence de l'eau oxygénée.

9°) *Avec le permanganate de potasse* = coloration rouge sale. En ajoutant à la solution de permanganate le réactif de Meyer, une

coloration vert foncé se produit, ce qui permet de penser devant une pareille réaction qu'il ne s'agit probablement pas de sang. En ajoutant l'eau oxygénée, une coloration rouge immédiate apparaît.

10°) *Avec la teinture d'iode* = coloration rouge. La coloration rouge violet foncé de la teinture d'iode disparaît dès qu'on ajoute le réactif, pour faire place à une coloration rose.

11°) *Avec l'encre bleue ou noire* = coloration rouge brun. Il se forme un précipité brun rouge. Par l'addition de l'eau oxygénée le précipité persiste mais la coloration devient plus intense.

Il résulte que parmi les substances minérales, quelques-unes se dérobent à tout moyen d'élimination des causes d'erreur. Ainsi parmi ces substances, avec lesquelles nous avons expérimenté, le sulfate de cuivre, le cuivre métallique, le laiton et le nickel, constituent des causes d'erreur irréductibles, et avec lesquelles on doit compter chaque fois qu'on pratique la réaction de Meyer. Certainement les causes d'erreur de la réaction ne se résument pas à ces quatre, elles doivent être plus nombreuses parmi les substances chimiques.

Substances organiques.

Parmi les substances organiques animales et végétales, avec lesquelles nous avons essayé la réaction de Meyer, nous n'avons jamais obtenu une réaction nettement positive, tandis que ces mêmes substances donnent des résultats positifs par la méthode de Van Deen. Nous ne voulons pas conclure qu'il n'y ait pas de substances organiques donnant la réaction de Meyer positive, il en existe probablement. Mais nos observations nous permettent de penser que ces substances sont bien rares. Ce qui appuie notre conclusion, c'est qu'il est difficile de concevoir qu'une réaction comme celle de Meyer, d'une sensibilité que nous avons trouvée à 1/1.000.000 en présence du sang, se montre si complètement insensible en présence des substances organiques considérées comme contenant des oxydases, comme le sperme, l'urine, la salive, etc...

Même si des substances organiques se trouvaient causes d'erreur de la réaction de Meyer, par une simple ébullition de la solution à examiner, elles seraient complètement évitées.

Des modifications de la méthode ont été préconisées, elles ne suppriment pas les causes d'erreur qui échappent aux simples précautions que nous avons déjà indiquées.

Valeur de la réaction.

La réaction de Meyer n'est pas rigoureusement spécifique du sang, mais sa spécificité relative est supérieure à celle de la réaction de Van Deen.

Le réactif de Meyer, bien qu'un peu plus délicat à préparer que celui à la teinture de gaïac, reste quand même d'une préparation facile et d'une bonne conservation. Son seul inconvénient sérieux est de s'oxyder à l'air, ce qui rend son emploi gênant pour les empreintes de Taylor.

Pratiquement il est intéressant de savoir que les matières organiques restent dans la plupart des cas inactives en présence du réactif.

La technique, comme l'interprétation de la réaction, sont faciles et rapides.

La vraie valeur de la réaction consiste dans sa sensibilité extrême, non seulement avec du sang frais, mais aussi avec du sang très vieux et profondément modifié.

III.

Réaction a la benzidine ou d'Adler

C'est pour la recherche du sang en clinique, que la réaction à la benzidine fut préconisée pour la première fois en 1904 par O. et R. Adler.

Elle fut appliquée en médecine légale à la suite des études de Merkel, Macweeney et Bordas.

Préparation du réactif.

La préparation du réactif consiste à faire une solution saturée de benzidine dans l'alcool à 95° ou dans l'acide acétique à 30 %. Les deux procédés ne se valent pas. Nous dirons plus loin pourquoi nous préférons la solution acétique de benzidine.

Certains auteurs préconisent la solution alcoolique de benzidine, additionnée d'acide acétique glacial. Ce procédé est à rejeter.

La préparation du réactif est très facile, car elle ne demande même pas une pesée, elle est aussi très rapide, car la benzidine se dissout facilement dans l'alcool à froid, comme dans l'acide acétique. On obtient ainsi une solution claire d'une faible coloration jaunâtre.

Additionnée d'eau oxygénée et en présence du sang, la solution saturée de benzidine dans l'alcool ou dans l'acide acétique, fraîchement préparée, prend en moins d'une minute une coloration verdâtre, qui passe au bleu plus ou moins intense, suivant la quantité de sang présent.

Conservation du réactif.

La conservation du réactif d'Adler est de courte durée. Au bout d'un jour ou tout au plus de deux jours, la solution alcoolique de benzidine s'altère. Le réactif se trouble et se colore fortement en jaune. La solution acétique de benzidine nous a semblé présenter une conservation un peu meilleure. Dans ce cas le réactif peut servir pendant trois ou quatre jours.

Donc, la conservation du réactif d'Adler est mauvaise.

Il est nécessaire par conséquent de préparer la solution de benzidine au moment de s'en servir ou tout au plus le même jour. Ceci ne constitue pas un grand inconvénient, la préparation du réactif étant, comme nous l'avons déjà dit, très facile et rapide.

Sensibilité du réactif.

La sensibilité du réactif à la benzidine est très grande. Elle est presque dix fois plus grande que la sensibilité de la réaction de Van Deen, et du leuco-vert-malachite. Les résultats obtenus avec des solutions de sang frais de plus en plus diluées, allant jusqu'à un sur trois cent mille, sont les suivants :

1/ 10,000 = Réaction positive immédiate.

1/100.000 = Réaction positive en une demi-minute.

Au bout d'une minute, la coloration est intense.

1/200.000 = Réaction positive en une minute. La coloration est faible, mais nettement perceptible.

1/300.000 = Réaction positive. Coloration bleu-vert, très faible, qu'on perçoit mieux à jour frisant.

La réaction est positive avec du sang vieux, putréfié, ou porté longtemps à l'ébullition. Ainsi nous avons obtenu des résultats positifs immédiats, en appliquant le réactif et de l'eau oxygénée sur des taches de sang, datant de cinq, six, sept et huit ans, reposant sur du linge ou sur du papier buvard. La réaction est encore positive avec des taches de sang datant de huit ans, traitées à la soude caustique, ensuite longtemps lavées à l'eau. Il en a été ainsi avec des taches de même date et traitées à l'acide sulfurique concentré et ensuite lavées à l'eau. La réaction est restée négative avec du sang calciné. Elle est nulle avec une solution sanguine fortement alcaline. La réaction est également nulle, si la solution sanguine contient un acide minéral concentré, comme l'acide sulfurique sirupeux. La présence d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire.

Technique de la réaction.

Avec du sang en solution, on opère de la façon suivante : On met dans un verre de montre quelques gouttes de la solution sanguine ; on ajoute le même volume de la solution acétique de benzidine fraîchement préparée ; puis on verse deux ou trois gouttes

d'eau oxygénée à 12 volumes. Une coloration bleu-vert apparaît rapidement, facile à constater, si on a soin de placer le verre de montre sur un papier blanc. La coloration verdâtre ou bleu-vert du début, passe rapidement au bleu plus ou moins foncé, suivant la teneur en sang de la solution.

Il est souvent plus facile de gratter la surface de la tache avec un scalpel au-dessus d'un verre de montre contenant une solution acétique de benzidine, qui dissout plus rapidement les taches de sang que la solution alcoolique, puis d'y ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée. Chaque parcelle contenant du sang devient alors le centre d'irradiation de traînées bleues qui diffusent dans le liquide.

Un autre procédé ressemblant à ce dernier, mais qui nous a paru plus sensible et plus élégant, est le suivant: On place au fond d'un couvercle en verre un papier buvard blanc préalablement essayé. On y verse suffisamment de solution de benzidine acétique pour bien l'imbiber, l'excès de liquide est jeté. On ajoute ensuite quelques gouttes d'eau oxygénée. S'il s'agit de taches très vieilles, il convient de verser quelques gouttes d'acide acétique glacial sur le papier buvard, ce qui augmente le pouvoir dissolvant du réactif. Au-dessus du papier buvard ainsi préparé, on gratte la tache suspecte. En présence de la moindre parcelle de sang tombée sur le papier au réactif, il se forme rapidement, en quelques secondes, d'abord une petite tache bleu-vert grossissant peu à peu et virant de plus en plus vers le bleu. La réaction provoquée éventuellement par la rouille est très tardive et ne constitue pas une cause d'erreur importante. L'avantage de ce procédé est que, n'ayant pas en présence un excès de liquide, la coloration de la moindre petite parcelle de sang ne diffuse que très lentement dans le papier buvard, laissant tout le temps nécessaire à l'observation, tandis que, avec un excès de liquide, elle serait vite disparue noyée dans celui-ci. Il y a aussi l'avantage du contraste qui existe entre le papier buvard blanc et la coloration bleu-vert qui tranche.

Ces deux derniers procédés par grattage, et spécialement le dernier, sont à conseiller en cas de taches de sang, reposant sur

des objets métalliques (fusils, couteaux, etc..), et mélangées à de la rouille. Car, si la rouille donne une réaction positive, cette réaction s'effectue très lentement et la coloration n'apparaît qu'après cinq ou six minutes, tandis que le sang aussi vieux qu'il soit, donne une réaction s'effectuant en quelques secondes, surtout en présence de quelques gouttes supplémentaires d'acide acétique glacial.

On peut avec le réactif d'Adler faire la recherche des taches de sang par le procédé des empreintes. Il est même indiqué, étant donné que ce réactif ne prend pas de coloration bleue à l'air, aussi longtemps qu'on l'expose. Le papier buvard préalablement essayé, doit être imprégné de réactif frais en solution acétique, auquel on peut ajouter quelques gouttes d'acide acétique glacial et cela pour accélérer la dissolution des vieilles taches de sang. Puis on procède comme nous l'avons déjà indiqué. Toute coloration vert-bleu sans addition d'eau oxygénée ne peut pas constituer un résultat positif. Si les taches suspectes se trouvent mélangées à de la rouille, sur des objets métalliques, et si on tient à éliminer la rouille, on peut faire des empreintes avec un papier buvard imprégné d'ammoniaque qui dissout rapidement les vieilles taches de sang, mais qui ne dissout pas la rouille. On neutralise l'ammoniaque ensuite par quelques gouttes d'acide acétique glacial, qu'on verse sur le papier après l'avoir enlevé de l'objet métallique et on procède à la réaction en ajoutant le réactif et l'eau oxygénée.

Il est important de ne jamais employer pour le procédé des empreintes la solution alcoolique de benzidine, et encore moins cette même solution additionnée d'acide acétique glacial, comme le préconise certains auteurs, toutes les fois que les taches reposent sur des objets métalliques et, en particulier, sur du fer ou sur du cuivre. La solution alcoolique saturée de benzidine et additionnée d'acide acétique glacial, donne en présence d'eau oxygénée et de fer métallique, une réaction positive. Le réactif d'Adler ainsi préparé donne également des réactions positives rapides avec le cuivre métallique, avec les sels de cuivre et avec les sels de fer. Avec la limaille de cuivre, nous avons obtenu également réaction positive intense et immédiate.

La solution alcoolique saturée de benzidine, sans addition d'acide acétique glacial, provoque des réactions positives avec le fer métallique, avec les sels de fer et avec les sels de cuivre.

Ajoutons enfin que la réaction d'Adler peut être pratiquée directement sur la tache de sang sans faire au préalable une solution. Il est bon d'employer la solution acétique de benzidine, qui dissout mieux les vieilles taches, ou d'ajouter à la solution alcoolique, toutes les fois qu'on ne craint pas la présence du fer, du cuivre métallique ou de leurs dérivés, un peu d'acide acétique glacial.

A part l'acide acétique glacial, on peut employer comme dissolvant l'ammoniaque, à condition de s'en débarrasser avant de pratiquer la réaction d'Adler, soit par évaporation, soit par neutralisation à l'acide acétique glacial. La présence d'ammoniaque, en temps qu'alcali dans la solution sanguine, rend impossible la réaction à la benzidine. L'ammoniaque serait surtout à conseiller comme dissolvant dans les cas où on veut se débarrasser de la rouille. En effet, l'ammoniaque dissout parfaitement le sang, mais ne dissout pas la rouille.

Causes d'erreur de la réaction.

Le réactif à la benzidine bleuit non seulement en présence du sang, mais aussi en présence de nombreuses autres substances qui peuvent être organiques ou minérales. Nous exposons plus loin une liste de quelques-unes de ces substances constituant les plus fréquentes causes d'erreur de la réaction d'Adler..

Substances minérales.

1°) *Le fer métallique* produit :

avec le réac. en solut. acét. et H^2O^2 = colorat. brun-rouge,

avec le réac. en solut. alcool. et H^2O^2 = colorat. bleu-vert non persistante,

avec le réac. en solut. alcool. + quelq. gouttes d'acide acétique glac. = coloration bleu-vert.

2°) *Le perchlorure de fer donne :*

avec le réac. en solut. acét. et H^2O^2 = colorat. brun-rouge,

avec le réac. en solut. alcool. = colorat. bleue virant rapidement vers le bleu très foncé. L'adjonction de l'eau oxygénée ne change rien à la coloration.

Une tache sèche de perchlorure sur du papier buvard donne :

avec le réac. en solut. acét. + H^2O^2 = colorat. brun-rouge ;

avec le réac. en solut. alcool. = colorat. brune. L'addition de l'eau oxygénée provoque coloration bleue intense.

3°) *Le sulfate de fer :*

avec le réac. en solut. acét. plus H^2O^2 = colorat. brun-rouge,

avec le réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. bleu-vert foncé.

Par la simple adjonction du réactif, le sulfate de fer donne un précipité grisâtre, lequel dès qu'on ajoute de l'eau oxygénée, prend une coloration vert-bleue intense pour devenir finalement d'une coloration brun-sale.

Une tache sèche de sulfate de fer sur papier buvard donne :

avec réac. en solut. acét. plus H^2O^2 = colorat. brun-rouge,

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = précipité bleu intense.

4°) *La rouille* produit :

avec réac. en solut. acét. plus H^2O^2 = colorat. verdâtre, tardive, en cinq, six minutes ou plus.

avec réac. en solut. alcool. = pas de coloration.

Si la rouille est dissoute préalablement dans de l'acide acétique glacial, la réaction peut être rapide.

5°) *Le cuivre métallique :*

avec réac. en solut. alcool .plus H^2O^2 = pas de coloration,

avec réac. en solut. acét. plus H^2O^2 = pas de coloration,

avec réac. en solut. alcool. additionné d'acide acét. glac. plus H^2O^2 = coloration bleu-vert intense, immédiate et persistante, virant de plus en plus au bleu.

Le cuivre limé avec réactif en solution alcool. additionné d'acide acétique glacial plus H^2O^2 = coloration bleue intense.

6°) *Le sulfate de cuivre* en solution :

avec réac. en solut. acét. = colorat. bleu-vert pâle. L'adjonction d'eau oxygénée ne change rien à la coloration,

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. bleue intense. Par simple adjonction du réactif, le sulfate de cuivre donne immédiatement un précipité brun-rouge qui démontre qu'on n'est probablement pas en présence de sang.

avec réac. en solut. alcool. additionné d'acide acét. glacial = coloration verte. Dès qu'on ajoute l'eau oxygénée, la coloration bleue apparaît.

Une tache de sulfate de cuivre sur papier buvard avec réac. en solut. alcool. plus l'eau oxygénée = coloration bleue intense rapide. La coloration commence d'abord, comme en présence du sang, par être verte puis vire rapidement au bleu plus ou moins intense, suivant la teneur de la tache en sulfate de cuivre.

7°) *Le permanganate :*

avec réact. en solut. alcool. = coloration bleue immédiate avant l'addition d'eau oxygénée. Même réaction si on ajoute au préalable quelques gouttes d'acide acétique glacial.

8°) *Le formol :*

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = coloration vert-bleu. La coloration est immédiate et intense mais elle disparaît rapidement. L'adjonction préalable d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire.

9°) *L'alumine :*

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = coloration verdâtre apparaîssant en quelques minutes.

Nous n'avons pas pu obtenir de réactions positives avec la pierre ponce.

Substances organiques.

1°) *La salive :*

avec réactif en solution acétique plus eau oxygénée = pas de coloration,

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = coloration vert-bleue rapide. La coloration n'est pas homogène, elle apparaît en quelques points de la préparation et ne s'étend que tardivement à tout le liquide.

La salive desséchée sur papier filtre:

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. vert-bleu.

La salive bouillie ne donne plus de réaction positive à la benzidine.

2°) *Le lait:*

avec réac. en solut. acét. plus H^2O^2 = pas de coloration,

avec réact. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. bleue immédiate.

Le lait bouilli ne provoque plus de réaction positive à la benzidine.

3°) *Le cuir vieux:*

avec réac. plus H^2O^2 = colorat. vert-bleue immédiate.

4°) *La farine:*

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. vert-bleue intense, immédiate, virant rapidement au bleu. Même si préalablement on ajoute de l'acide acétique glacial, la réaction reste positive, elle semble même plus intense. La farine bouillie ne donne plus de réaction positive à la benzidine.

5°) *La mie de pain:*

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. bleue au bout d'une minute. L'addition préalable d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire, mais la coloration est plutôt verte que bleue.

6°) *Les grains de riz* pilés dans un mortier:

avec réac. en solut. alcool. plus H^2O^2 = colorat. vert-bleue. L'adjonction au préalable d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire. Les grains de riz bouillis ne donnent plus de réaction positive à la benzidine.

7°) *Les légumes frais* comme: le chou, la carotte, l'épinard, le navet, le céléris, la pomme de terre, l'oignon, l'ail, la feuille

de salade, etc., tous sont capables de donner une réaction positive en présence d'eau oxygénée et de réactif à la benzidine, soit en solution alcoolique, soit en solution acétique. Avec ces légumes cuits, la réaction ne se produit plus.

8°) *Les fruits* comme: poire, pomme, etc.., donnent réaction positive en présence du réactif à la benzidine et en présence de l'eau oxygénée. L'adjonction préalable d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire.

9°) *Les légumes secs* comme: haricots blancs, pois secs, lentilles, qu'on décortique d'abord dans un mortier, donnent des réactions positives à la benzidine. L'adjonction préalable d'acide acétique glacial n'empêche pas la réaction de se produire. Portés à l'ébullition, ces légumes ne donnent plus de réaction positive.

La liste que nous venons d'exposer ne comprend certainement pas toutes les substances capables de bleuir la solution de benzidine en présence d'eau oxygénée. Avec une partie des substances que nous avons citées comme causes d'erreur de la réaction, nous avons tantôt obtenu des réactions positives, tantôt des réactions négatives, suivant que nous employions la solution alcoolique de benzidine, ou la solution acétique. Ainsi avec la solution acétique de benzidine, on peut éviter les causes d'erreur que peut entraîner la présence du fer métallique, ou de sels de fer, excepté la rouille. La solution acétique de benzidine en présence de fer métallique ou de sels de fer et de l'eau oxygénée, ne provoque pas une coloration vert-bleue comme cela arrive si on emploie la solution alcoolique de benzidine, mais une coloration brun-rouge. En présence du cuivre métallique et d'eau oxygénée, la solution acétique, comme la solution alcoolique, ne donne pas de réaction positive. Ici les deux procédés se valent. Mais il faut complètement rejeter toutes les fois qu'on soupçonne la présence des substances minérales, et spécialement du cuivre métallique, le procédé qui consiste à ajouter à la solution alcoolique de benzidine, de l'acide acétique glacial. Car un réactif ainsi préparé, mis en présence du fer métallique, ou surtout du cuivre métallique et d'eau oxygénée, provoque une coloration vert-bleue in-

tense, immédiate, en tout identique à celle que le réactif d'Adler produit en présence du sang et d'eau oxygénée. Avec les sels de cuivre, la solution acétique de benzidine, non additionnée d'eau oxygénée, produit une coloration bleu-vert pâle. Ceci constitue un résultat négatif. Il en résulte qu'il est préférable d'employer le réactif d'Adler en milieu acétique (acide acétique à 30 %), qui a également l'avantage de supprimer quelques causes d'erreur qu'entraînent la plupart des substances organiques. Ces substances sont en effet très nombreuses.

L'acide acétique glacial, préconisé à propos de la réaction de Van Deen, pour empêcher l'action des oxydases, autres que celle du sang, n'a plus cette fois la même valeur. Bien au contraire, il semble parfois, en présence des substances organiques, rendre plus intense la réaction à la benzidine.

C'est par l'ébullition qu'on arrive à éliminer toutes ou presque toutes les causes d'erreur que provoque la présence de substances organiques. Aussi est-il bon d'y recourir, toutes les fois qu'on craint la présence des substances organiques et chaque fois qu'il est possible. Disons que l'ébullition n'a aucune action sur les substances minérales et qu'elle ne peut par conséquent pas supprimer les causes d'erreur qu'elles provoquent.

En suivant la technique opératoire que nous avons indiquée à l'occasion du mode d'emploi de la réaction, on n'acceptera pour positive que la réaction s'effectuant après l'addition d'eau oxygénée. Toute coloration même bleu-vert, apparaissant avant cette addition, est sans valeur.

Toute réaction nécessitant un laps de temps plus long qu'une minute au maximum, ne doit pas compter comme résultat positif.

Ajoutons aussi qu'un résultat positif à la benzidine exige la coloration bleue. La réaction peut débuter par une coloration verte, mais celle-ci vire rapidement au bleu en présence du sang. Ainsi toute autre coloration doit exclure tout résultat positif. La coloration verte ne virant pas au bleu au bout d'une minute ne peut pas constituer un résultat positif.

Malgré les innombrables causes d'erreur, dont la réaction

d'Adler est entachée, on arrive, en appliquant ces quelques précautions, à en faire une méthode de probabilité, inférieure peut-être aux trois autres méthodes que nous étudions, en ce qui concerne la spécificité, mais qui garde ses indications particulières. Aussi la réaction à la benzidine, ne donnant pas de coloration bleue en présence du cuivre et de sels de cuivre, à condition, nous le répétons, d'employer la solution acétique de benzidine, est appelée à éliminer une grande cause d'erreur de la réaction de Meyer.

La réaction d'Adler peut être utile dans le procédé des empreintes de Taylor.

Valeur de la réaction.

La réaction à la benzidine constitue le type des réactions colorantes de probabilité. Elles présentent une grande sensibilité qui est la qualité primordiale de ces réactions, par contre, sa faible spécificité pour le sang est son grave défaut. La réaction d'Adler est la réaction colorante la moins spécifique de toutes les quatre que nous étudions et ceci est dû au fait que seule l'ébullition, qui n'est pas toujours possible, peut empêcher l'action des oxydases autres que la péroxydase. Comparée à la réaction de Van Deen, elle ne la dépasse que par sa sensibilité, comme nous l'avons déjà vu. Le réactif d'Adler est d'une mauvaise conservation.

Les qualités que la réaction d'Adler présente consistent dans la facilité et la rapidité avec lesquelles on prépare le réactif, qui ne bleuit pas seul à l'air, dans sa grande sensibilité, dans la rapidité et la simplicité de la réaction en général et dans sa facile interprêtation. La réaction étant nulle en présence de certains métaux et sels métalliques, qui constituent des causes d'erreur pour d'autres réactions, elle est appelée dans certains cas, à compléter ces réactions.

IV.

Réaction au leuco-vert-malachite

La réaction par le leuco-vert-malachite fut indiquée en 1904 par O. et A. Adler.

Préparation du réactif :

Vert-leuco-malachite	1 gr.
Acide acétique glacial	100 cm^3.
Eau distillée	150 cm^3.

Ce réactif est plus ou moins coloré en vert-bleu, ce qui constitue un inconvénient sérieux chaque fois qu'on veut employer ce réactif par le procédé des verres de montre ; car il ne s'agit plus d'observer l'apparition de la coloration bleu-vert qui existe déjà, mais son intensité ce qui est beaucoup plus difficile.

En présence du sang et d'eau oxygénée, le réactif au leuco-vert-malachite produit une coloration vert-bleue intense, dans un laps de temps ne dépassant pas une minute.

Conservation du réactif :

A l'abri de l'air et de la lumière du soleil, le réactif se conserve très longtemps. Nous avons utilisé un réactif au leuco-vert-malachite préparé six mois d'avance. La conservation du réactif est donc très bonne.

Sensibilité du réactif :

La réaction au leuco-vert-malachite est très sensible en présence du sang. Nous avons déterminé son degré de sensibilité par le procédé des verres de montre et nous avons obtenu une réaction positive limite, avec une dilution de sang frais de 1/20.000. Mais déjà à cette dilution le laps de temps nécessaire à l'apparition de la coloration dépasse une minute. Aussi cette sensibilité approche

celle de la réaction de Van Deen et par conséquent se trouve être inférieure à celle de la réaction de Meyer et d'Adler à la benzidine.

Avec du sang vieux et putréfié, nous avons constaté que la sensibilité de la réaction diminue. Ainsi avec une solution d'un sang pareillement modifié, nous avons constaté que la sensibilité de la réaction ne s'élève plus qu'à 1/10.000. Mais avec des solutions plus concentrées nous avons encore obtenu des résultats très nets et immédiats (en 10 secondes), avec du sang putréfié, avec des taches de sang datant de cinq, six, et huit ans, avec du sang longtemps bouilli, jusqu'à l'évaporation presque complète de la partie liquide, avec des vieilles taches de sang traitées à la soude et ensuite lavées à l'eau, la réaction ne pouvant pas s'effectuer en milieu alcalin.

Nous avons, par contre, obtenu des résultats négatifs en présence du sang calciné et en présence de sang traité préalablement à l'acide sulfurique concentré.

Technique de la réaction :

Malgré sa bonne conservation, il est bon d'éprouver le réactif et surtout l'eau oxygénée en présence du sang.

Pratique de la réaction :

Etant donné l'inconvénient que constitue la coloration bleu-vert du réactif, son emploi par le procédé des godets est à rejeter. Son emploi doit se faire par le procédé des empreintes de Taylor ou celui du grattage .En présence d'une tache sur un objet métallique ou sur une étoffe, on imbibe un papier filtre préalablement éprouvé, avec du réactif et on le place au fond d'une petite cuvette en verre. Absorbé ainsi par le papier buvard blanc, la coloration bleu-vert du réactif est considérablement atténuée. Au-dessus de ce papier ainsi préparé, on gratte légèrement la surface de la tache à l'aide d'une aiguille. Les particules de substan-

ce provenant du grattage, tombées sur le papier buvard ne doivent provoquer aucune coloration, si nous sommes en présence de sang. Mais si ensuite on laisse tomber sur le papier buvard quelques gouttes d'eau oxygénée, il apparaît rapidement autant de petites taches vert-bleu, qu'il y a de grains de poussières de sang. Ces taches s'étalent et au bout d'un certain temps tout le papier buvard est uniformément bleu-vert.

La rapidité de la réaction, même en présence de très vieilles taches de sang, s'explique par le grand pouvoir dissolvant que présente le réactif et qui est dû à l'importante proportion d'acide acétique glacial qu'il contient.

Certains auteurs préconisent l'emploi du réactif préalablement mélangé d'eau oxygénée. Nous ne sommes pas de cet avis; car en suivant la technique que nous avons indiquée, nous évitons certaines causes d'erreur dues au fait qu'il y a des substances chimiques qui provoquent une coloration bleu-vert en présence du réactif, avant toute adjonction d'eau oxygénée. On ne doit tenir aucun compte de pareils résultats.

Quant aux empreintes de Taylor, il est nécessaire de procéder de la manière suivante: On imbibe d'eau distillée un papier buvard blanc, préalablement éprouvé, et on l'applique sur la tache suspecte. Après quelques minutes, on retire le papier buvard et on le traite par le réactif. Aucune coloration ne doit se produire. On ajoute ensuite quelques gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes, diluée au dixième. Si nous sommes en présence de sang, des taches bleues apparaîtront et indiqueront la présence probable et la situation des taches de sang.

Nous avons obtenu des résultats très satisfaisants en imprégnant le papier buvard, non pas d'eau distillée mais d'ammoniaque pur, qui dissout comme nous l'avons déjà dit, très bien et rapidement les vieilles taches de sang, et qui a surtout l'avantage de pouvoir être appliqué sur des objets métalliques et spécialement sur du fer, tout en évitant la cause d'erreur la plus importante, qui est la présence du fer métallique.

Après avoir retiré le papier buvard ayant servi à l'empreinte,

on neutralise l'ammoniaque s'il n'est pas encore complètement volatilisé, par un peu d'acide acétique glacial, et on procède à la réaction en ajoutant d'abord le réactif et en observant si aucune coloration bleu-vert n'apparaît. S'il n'y a aucun changement de coloration, on ajoute l'eau oxygénée qui doit provoquer, si nous sommes en présence du sang, une coloration bleu-vert rapide, épousant la forme des taches.

Nous conseillons ce procédé de l'empreinte à l'ammoniaque pur dans tous les cas où on est en présence de sang reposant sur du fer. Par contre, on doit rejeter le procédé des empreintes avec le papier buvard imprégné préalablement d'un mélange de réactif et d'eau oxygénée ou même de réactif sans eau oxygénée. En effet, le fer métallique comme certains sels de fer, en présence du réactif et de l'eau oxygénée, provoque immédiatement une coloration bleu-vert très semblable à celle qu'on obtient en présence du sang. Est aussi à rejeter l'emploi de l'acide acétique glacial comme dissolvant des taches de sang, chaque fois que celles-ci reposent sur des objets métalliques et spécialement sur du fer, car l'acide acétique attaque très rapidement le fer. En plongeant pendant quelques instants un morceau de fer dans un verre de montre contenant de l'acide acétique glacial, et si, à ce dernier, on ajoute du réactif et de l'eau oxygénée, il se produit une coloration très analogue à celle qu'on aurait obtenue en présence du sang.

Il a été préconisé pour des traces tout-à-fait minimes de sang, un autre procédé d'emploi du réactif au leuco-vert-malachite qui est le suivant: On prend une baguette de verre à bout arrondi, ayant l'épaisseur d'un millimètre environ. On humecte le bout arrondi de la baguette au moyen d'un filtre mouillé, puis on l'appuie pendant quelques secondes contre la tache suspecte, en tournant la baguette entre les doigts. On essuie ensuite le bout de la baguette sur un morceau de papier filtre imbibé de réactif et d'eau oxygénée faible. Si la tache est constituée par du sang, on devrait obtenir en quelques secondes sur le papier filtre une tache verte. Mais nous pouvons dire, pour l'avoir expéri-

menté, que ce procédé est tout-à-fait incertain et qu'en présence de vieilles taches, il est complètement à rejeter. En effet, la quantité infime de liquide qui humecte le bout de la baguette est très insuffisante pour la dissolution d'une vieille tache de sang, malgré la pression exercée par la *baguette*. En présence de taches que nous savions être du sang, il nous est arrivé souvent de retirer la baguette de verre sans la moindre trace de sang.

En résumé, les modes d'emploi les meilleurs du réactif au leuco-vert-malachite, que nous conseillons, sont: le procédé du grattage de la tache au-dessus d'un papier filtre imbibé de réactif, et le procédé des empreintes.

Grâce à son acidité importante, le réactif empêche à lui seul l'action de toute autre oxydase, excepté bien entendu l'oxydase du sang. Par conséquent, toutes les causes d'erreur provoquées par les substances organiques sont éliminées. Ceci constitue un avantage important de la réaction au leuco-vert-malachite sur toutes les autres réactions colorantes, et sa spécificité s'en trouve meilleure.

Causes d'erreur de la réaction.

La réaction au leuco-vert-malachite ne fait pas exception et comme toutes les réactions colorantes, elle présente des causes d'erreur: les unes faciles, d'autres impossibles ou très difficiles à éliminer. Nous avons dit que les substances organiques ne provoquent pas de causes d'erreur de la réaction. Mais il reste les substances inorganiques parmi lesquelles les unes que nous avons déjà décrites dans le chapitre de la pratique de la réaction, constituent des causes d'erreur très importantes et irréductibles à notre avis, qui n'est pas celui de certains auteurs.

Comme pour les autres réactions que nous avons déjà étudiées, nous allons exposer quelques-unes de ces causes d'erreur, et nous dirons à propos de chacune, s'il y a moyen de les éliminer.

Substances minérales.

1°) *Avec le fer métallique :* = coloration bleu-vert immédiate et identique à celle qu'on obtient en présence du sang. Sans la présence d'eau oxygénée, le fer ne provoque aucune réaction. Pour éviter cette cause d'erreur, nous l'avons déjà dit, il faut pratiquer toutes les fois que la tache à examiner repose sur du fer, le procédé par grattage ou les empreintes de Taylor, en imbibant le papier buvard d'eau distillée ou d'ammoniaque.

Ayant eu dans une affaire criminelle à chercher des taches de sang sur des couteaux, où, ni avec la loupe binoculaire, ni par d'autres moyens, nous n'avons rien pu déceler, nous avons appliqué en suivant les indications de certains auteurs trop enthousiastes pour la réaction au leuco-vert-malachite, des empreintes avec du papier buvard imbibé d'un mélange de réactif et d'eau oxygénée a 1 % (eau oxygénée à 12 volumes diluée au dixième). En retirant le papier buvard, nous avons été étonnés de voir que toute sa surface ayant été en contact avec les lames de couteaux présentait une coloration bleu-vert uniforme. Nous avons fait alors des empreintes analogues sur des morceaux de fer dont nous étions sûrs qu'ils n'avaient jamais été en contact avec du sang et nous avons obtenu le même résultat.

Pour tirer tout ce que cette affaire présente d'instructif, avouons aussi que notre recherche d'identification des taches de sang fut complètement compromise, une tache de sang traitée au leuco-vert-malachite n'étant plus utilisable pour la pratique d'aucune réaction de certitude, ni cristallographique, ni spectroscopique, qui reste toujours négative dans ces conditions .Ajoutons aussi qu'une tache de sang traitée au leuco-vert-malachite ne convient plus également à la réaction de Bordet.

Avec de la limaille de fer répandue sur un papier filtre imbibé de réactif et en présence d'eau oxygénée, nous avons obtenu des petites taches vert-bleu immédiates qui grossissent peu à peu et qui sont identiques à celles qu'on obtient par grattage d'une tache de sang. Seulement après une ou deux minutes elles

prennent une coloration jaune-verte, ce qui peut les distinguer des taches produites par le sang, lesquelles persistent dans leur coloration vert-bleu foncée.

2°) *Avec la rouille* nous avons constamment obtenu des résultats négatifs. De sorte que le grattage d'une tache de sang, reposant sur un objet rouillé, ne constitue pas une cause d'erreur.

3°) *Avec le sulfate de fer* en solution = coloration bleu-vert immédiate apparaîssant seulement en présence d'eau oxygénée et de réactif. Avec des taches de sulfate de fer sur du papier buvard datant de plusieurs jours, nous avons obtenu le même résultat.

4°) *Avec le perchlorure de fer* en solution = coloration verte à faibles reflets bleus. Avec un peu d'habitude de la réaction, on peut facilement éviter cette cause d'erreur. Même résultat avec des taches de perchlorure de fer. Seulement après une minute et plus, des points bleus apparaîssent en marge de la tache.

5°) *Avec le chlorure ferrique* = coloration bleu-vert, avant l'addition d'eau oxygénée.

6°) *Avec l'iodure de fer* = résultat négatif.

7°) *Avec le nickel* = coloration bleu-vert rapide.

8°) *Avec le permanganate* = coloration bleu-vert immédiate. La coloration apparaît avant l'addition d'eau oxygénée, ce qui permet d'éviter cette cause d'erreur. Même résultat avec des taches de permanganate.

9°) *Avec le péroxyde de manganèse* = coloration bleu-vert immédiate avant l'addition d'eau oxygénée.

10°) *Avec le minium* = coloration bleu-vert très intense, avant l'addition d'eau oxygénée.

11°) *Avec le bichromate de potassium* = coloration bleu-vert avant l'addition d'eau oxygénée.

L'alun, le plomb, le cuivre, le laiton, ne provoquent pas de réaction positive.

Valeur de la réaction.

Exécutée comme nous venons de la décrire, sur papier filtre, avec observation de l'apparition chronologique et de la coloration des taches, la réaction par le leuco-dérivé du vert-malachite, est d'une grande spécificité, mais n'oublions pas d'ajouter, cette fois encore, que sa spécificité n'est pas absolue quoiqu'elle surpasse celle de beaucoup d'autres épreuves de probabilité.

En outre, sa sensibilité bien qu'inférieure à celle d'autres réactions que nous avons déjà étudiées, satisfait à toutes les nécessités. Elle réussit comme nous l'avons vu, avec des taches très vieilles, avec des taches de sang en pourriture, avec des traces de sang presque complètement carbonisé. Rapide, facile à pratiquer, le réactif se conservant très bien, la réaction au leuco-vert-malachite est une des meilleures réactions de probabilité.

Conclusions.

Aucune des réactions colorantes n'a une valeur positive absolue, aucune n'est spécifique du sang. Elles peuvent toutes donner des résultats positifs avec des produits autres que le sang. Par contre elles ont toutes une valeur négative absolue. La combinaison de plusieurs de ces méthodes, tout en étant susceptible d'améliorer dans certains cas les résultats, n'élimine pas toutes les causes d'erreur. Néanmoins, la valeur médico-légale des réactions de probabilité est très importante. Rapides, faciles à pratiquer, avec leur sensibilité extrême, elles ont par leurs résultats positifs une importance capitale comme moyen d'investigation. Elles dépistent les taches les plus petites, les plus modifiées par le nettoyage, les moins perceptibles par d'autres moyens. Elles indiquent l'endroit précis où d'autres moyens d'identification sont appelés à apporter la certitude. Sans leur aide importante bien souvent les réactions de certitude seraient vouées à l'échec.

Grâce justement à leur grande sensibilité, les réactions de probabilité ne nécessitent qu'une quantité infime de matériel, ce

qui ne compromet en rien les réactions de certitude ultérieures. En présence des quantités de sang par trop insuffisantes, où les réactions de certitude sont vouées à l'échec complet, elles peuvent encore apporter une indication probable, il est vrai, mais qui constitue toujours un résultat.

Par leurs résultats négatifs qui ont une valeur absolue, les réactions de probabilité mettent fin à toute autre recherche inutile. Elles dispensent l'expert de longues et délicates réactions de certitude et lui économisent son temps.

Voici ce qu'écrit un expert ayant pendant de longues années employé ces réactions:

«Les réactions dites *de probabilité,* pour la recherche de traces de sang, sont généralement peu considérées dans les traités classiques de chimie et de médecine légale. Cela tient aux nombreux défauts de certaines de ces méthodes, à leur manque de spécificité surtout, mais en partie aussi à une méthode d'application défectueuse ou encore à une généralisation inadmissible des cas. C'est pourquoi certains auteurs préconisent d'y renoncer afin d'éviter des pertes inutiles de matériel, et de n'utiliser comme unique méthode préliminaire qu'une bonne loupe. Mais en se servant uniquement de la loupe et des méthodes cristallographiques et spectroscopiques, on se trouverait dans de nombreux cas devant un résultat absolument négatif, où l'application judicieuse d'une bonne méthode *de probabilité* et éventuellement la renonciation à la méthode cristallographique aurait pu démontrer non seulement la présence du sang, mais encore sa nature comme sang humain.

«Dans tous les cas où il s'agit de traces minimes de sang, l'application d'une bonne méthode *de probabilité* est indispensable, surtout si elle peut être faite pratiquement sans perte de matériel. En cas de fines et rares gouttelettes de sang, avec toute la patience dont on peut disposer, on ne trouvera rien ou bien avec un peu de chance on trouvera quelque chose, ceci en se servant de la loupe jumelle Zeiss.

«A défaut de méthodes *de probabilité* on devrait procéder alors sur toutes ces taches douteuses, à la préparation des cristaux d'hémine, travail très long, qui conduira à bien des résultats négatifs, même en présence du sang. Cette méthode cristallographique exigera en outre tout le matériel des taches minuscules, et il n'en restera rien pour la recherche du sang humain. Si cette inspection oculaire conduit à un résultat négatif, on peut dire seulement qu'on n'a rien trouvé, mais on ne peut pas dire que sur les surfaces examinées il n'y a pas de sang décelable. *Cela*

on peut le dire seulement si l'application raisonnée d'une bonne méthode de probabilité a donné un résultat négatif.

«L'application d'une bonne méthode *de probabilité* évite donc souvent un travail considérable et superflu, tout en augmentant la certitude des recherches, et cela, je le répète, sans perte appréciable de matériel, qui reste ainsi réservé à l'application d'autres preuves.

«Que veut-on faire sans une telle méthode, par exemple dans le cas d'une lame de couteau bien nettoyée après le crime? On trouvera peut-être des taches de sang dans l'onglet, ou dans des lettres ou marques de fabrique incrustées dans la lame, ou encore dans la rigole microscopique formée par le bord du tranchant recourbé. Mais toutes ces traces sont trop faibles pour permettre l'application des méthodes cristallographiques et spectroscopiques. Et pourtant il est du devoir de l'expert de signaler ces traces et d'en démontrer la nature comme sang! Ou encore dans le cas de traces minimes de sang dans les rayures microscopiques d'un projectile? Dans tous ces cas une bonne méthode *de probabilité* est indispensable. Elle le sera encore s'il s'agit par exemple de retrouver des traces de sang sur un plancher, dans un cas d'avortement, ou d'accouchement clandestin, ou d'un crime. Ce plancher a naturellement été nettoyé depuis le fait. Ou encore s'il s'agit de chercher ces traces de sang sur la surface inférieure encrassée d'une auto ayant écrasé un homme... (1)».

Toutes ces considérations si bien exposées par Mr. Medinger, démontrent pleinement l'intérêt indiscutable qu'on doit apporter en médecine légale aux réactions colorantes, dites de probabilité, pour l'identification du sang, et justifient également le but d'une partie de notre thèse qui fut l'étude des principales de ces méthodes. Nous nous sommes efforcés de déterminer leur valeur exacte et pour cela nous avons mis en évidence leurs défauts comme leurs qualités. A chacune d'elles dans la mesure de nos possibilités, nous avons apporté quelques observations que nous croyons utiles à la pratique de ces réactions.

---

(1) Pierre Medinger, Revue internationale de criminalistique, 1931.

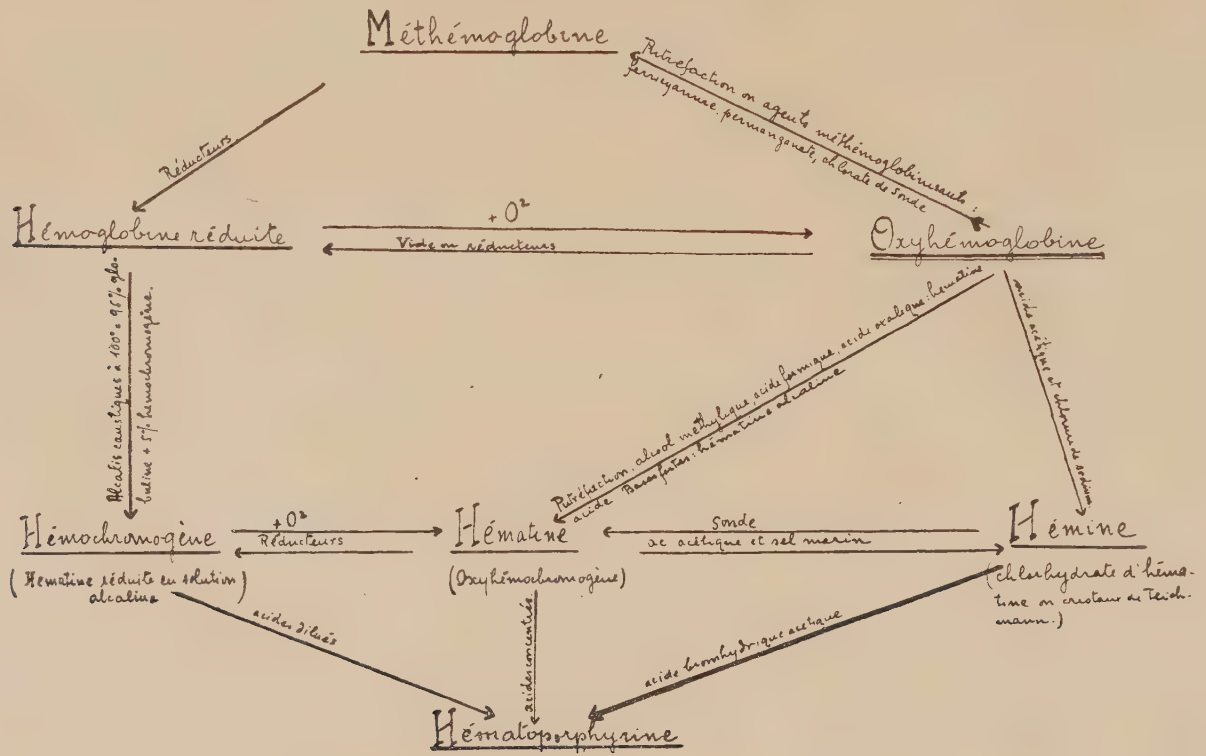
TABLEAU

	I. Réaction de VAN DEEN	II. Réaction de MEYER
1) **Sensibilité** a) sang frais	1/20.000	1/1.000.000
b) sang vieux	Diminution notable (suivant le vieillissement).	Faible diminution
2) **Conservation du réactif.**	Très bonne (flacon bien bouché) des mois	Très bonne (poudre de zinc) des mois.
3) **Modes d'emploi indiqués suivant le réactif.**	Solution (verres de montre) ou empreintes de Taylor.	Solution (verres de montre).
4) **Solvant des vieilles taches selon le réactif employé.**	Acide acétique glacial pur ou ammoniaque pur (s'en débarrasser après dissolution).	Ammoniaque pur.
5) **Causes d'erreur.** a) substances organiques donnant réaction positive.	Salive, lait, farine, pomme de terre, feuille de salade, raisin, jus de prune, etc...	Rien trouvé.
Moyens de les éviter.	Ebullition de la solution sanguine ou addition d'ac. acét. glac.	Pour plus de précautions ébullition de la solut. sanguine.
Substances organiques ne donnant pas réact. positive.	Urine, sperme, mucus vaginal, gomme arabique, jus de tomate, etc..	Lait, épinard, pomme, urine, sperme, mucus vaginal, pomme de terre, raisin, oignon, ail, mie de pain, pétales de fleurs, glucose, tannin, etc...
b) substances minérales donnant réact. positive.	Sulfate de fer, perchlorure de fer, iodure de fer, sulfate de cuivre, permanganate, etc..	Sulfate de cuivre, cuivre métallique, laiton, nickel, sulfate de fer, perchlorure de fer. Ferrocyanure et ferricyanure de potassium, permanganate, teinture d'iode, l'encre bleue ou noire, etc...
Substances minérales ne donnant pas réact. positive.	Ammoniaque, rouille, teinture d'iode, fer métallique, cuivre métallique, etc...	Rouille, ammoniaque, iodure de fer, fer métallique, bromures et iodures alcalins etc...

SYNOPTIQUE.

III. Réaction à la benzidine		IV. Réaction au leuco-vert-malachite.
solution acétique 1/200.000	**solution alcoolique.** 1/200.000	1/20.000
Peu diminuée	Peu diminuée	Diminuée
Mauvaise (un ou deux jours).	Mauvaise (trois ou quatre jours).	Très bonne (à l'abri de l'air et lumière du soleil) des années.
Grattage de la tache ou solut. (verres de montre), empreintes de Taylor.	Solution (verres de montre).	Grattage ou empreintes de Taylor.
Acide acétique glacial pur.	Ammoniaque (laisser volatiliser après dissolution).	Le réactif lui-même ou en présence de métaux: ammoniaque (laisser volatiliser après dissolution).
Farine, mie de pain, légumes frais, fruits, légumes secs, etc...	Salive, lait, farine, mie de pain, grains de riz pilés, choux, carotte, épinard, navet, céléris, pomme de terre, oignon, ail, feuille de salade, poire, légumes secs, etc...	Aucune.
Ebullition de la solution sanguine ou l'addition d'acide acétique glacial.	Ebullition de la solution sanguine.	
Salive, lait, urine, sperme, etc...	Urine, blanc d'œuf, jus de pomme, jus de citron, jus de raisin, glycérine, sperme, etc...	Urine, sperme, mucus vaginal, lait, légumes verts, légumes secs, tannin, glucose, etc..
Rouille, formol, permanganate, etc...	Fer métallique, perchlorure de fer, sulfate de fer, sulfate de cuivre, formol, permanganate, etc...	Fer métallique, sulfate de fer, nickel, permanganate peroxyde de manganèse, minium, bichromate de potassium, etc...
Cuivre métallique, ammoniaque, aluminium.	Rouille, ammoniaque, cuivre métallique, aluminium.	Cuivre métallique, plomb, alun, etc.

Produits de transformation de l'hémoglobine



DEUXIÈME PARTIE.

RÉACTIONS DE CERTITUDE.

Lorsque, en cherchant à identifier la nature sanguine d'une tache, on obtient une ou plusieurs réactions de probabilité positives, il est indispensable de chercher à mettre en évidence les caractères vraiment spécifiques du sang si l'on veut affirmer avec certitude la présence du sang. Pour cela on pratique les réactions dites de certitude, lesquelles sont : microscopiques, microchimiques ou cristallographiques et microspectroscopiques.

A l'inverse de ce que nous avons dit à propos des réactions de probabilité, les réactions de certitude ont une valeur certaine et absolue par leurs résultats positifs. Leurs résultats négatifs n'ont par contre aucune valeur. C'est justement à cause de cela que les réactions de probabilité et de certitude se complètent les unes les autres.

Nous décrirons d'abord les principales méthodes microchimiques sans nous attarder trop sur la description de celles classiquement connues. Ensuite nous étudierons les méthodes microspectroscopiques. Les méthodes microscopiques étant de moindre valeur nous les laisserons de côté.

Nous rappelons sous forme d'un tableau les différents produits de transformations du pigment sanguin ; transformations qui sont appliquées à l'identification du sang.

Méthodes cristallographiques.

Les méthodes cristallographiques sont des méthodes microchimiques très sensibles et tout-à-fait caractéristiques du sang.

Le principe de ces réactions consiste dans le fait suivant: Le sang traité par l'acide acétique glacial donne des cristaux de chlorhydrate d'hématine, d'iodhydrate ou de bromhydrate d'hématine, suivant que les cristaux se forment en présence de chlorure de sodium, chlorure de magnésium, iodure de potassium, acide iodhydrique ou bromure de potassium.

I. *Méthode de Teichmann.*

C'est la méthode cristallographique classique, la plus ancienne. Il s'agit de la formation de cristaux de chlorhydrate d'hématine, appelés également cristaux d'hématine, ou de Teichmann, qui est le nom de celui qui les découvrit en 1853. La méthode comporte deux procédés.

Dans le procédé lent, on opère de la manière suivante: On dépose une goutte de la solution à identifier sur une lame porte-objets et on évapore sur une table chauffante en évitant de dépasser 60° pour ne pas coaguler les matières albuminoïdes. Nous avons constaté que l'addition à la solution sanguine d'une goutte de chlorure de sodium au millième, est inutile. Lorsque la première goutte de solution est évaporée, on ajoute de nouveau une goute en faisant attention de la placer exactement à la même place que la première, on évapore de nouveau et on recommence ainsi un nombre de fois nécessaire pour avoir après évaporation un résidu suffisamment coloré. On dépose ensuite sur le résidu une goutte d'acide acétique cristallisable et on évapore doucement à siccité. On recommence cette opération plusieurs fois, on laisse refroidir et on examine au microscope. Les cristaux de Teichmann ont la forme de prismes allongés, leur couleur varie du brun-foncé au brun-clair et ils sont translucides.

La taille des cristaux d'hémine varie de 1 à 20 μ

Ce procédé présente un grave inconvénient qu'on arrive très difficilement à éviter; l'acide acétique glacial étant très volatil, s'étale rapidement sur la lame pendant son évaporation et entraîne en même temps la tache de sang ce qui fait manquer le but pour-

suivi, qui est de conserver une préparation de très petite étendue. On obtient alors une préparation trop étalée dans laquelle les cristaux sont rares et peuvent même passer inaperçus. Pour éviter cet inconvénient, il faut tenir la lame horizontalement au moment où on dépose la goutte d'acide acétique. Nous avons l'habitude avant d'ajouter cet acide, de chauffer la lame porte-objets en décrivant au-dessus de la flamme d'une veilleuse du bec Bunzen un cercle chauffé tout autour de la tache de sang. On dépose ensuite au milieu de ce cercle la goutte d'acide acétique glacial qui sera comme emprisonnée sur la tache de sang. Ensuite on continue à chauffer doucement, non pas le centre, mais le pourtour de la préparation. On peut également se servir de la table chauffante d'Ogier.

Le procédé dit rapide est identique au précédent, sauf sur ce point qu'après avoir desséché la solution sanguine, toujours à basse température, on recouvre le résidu d'une lamelle couvre-objets, et on y introduit par capillarité une ou plusieurs gouttes d'acide acétique glacial. On porte ensuite à l'ébullition pendant quelques minutes. Aussitôt que la goutte d'acide acétique est évaporée on la remplace par une autre. Une dernière fois on ajoute de l'acide acétique, mais on ne porte plus sur la flamme ou sur la table chauffante, car les cristaux seront d'autant plus gros que l'évaporation finale se produit plus doucement. Après refroidissement on fait l'examen microscopique.

Ce procédé tout en étant plus rapide que le précédent reste quand même assez long et offre l'inconvénient d'étendre beaucoup la préparation et d'en rendre par suite l'examen plus difficile. D'un autre côté l'ébullition fait souvent projeter la lamelle, ce qui rend la préparation inutilisable. Pour éviter cela, il ne faut pas agir trop rapidement, il faut atteindre très lentement le point d'ébullition.

Le procédé rapide ne peut pas remplacer dans tous les cas le procédé lent. Ce dernier est indiqué quand on se trouve en présence d'une très petite quantité de sang et qu'on est obligé de concentrer la préparation à une étendue minima.

Quel que soit le procédé que l'on choisisse, la méthode de Teichmann reste longue et nécessite de la part de l'opérateur le tour de main que seule la pratique continue de la méthode peut entretenir. De même que toutes les méthodes cristallographiques, la méthode de Teichmann n'est pas toujours fidèle et si on peut affirmer qu'il y a du sang dans le cas d'une réaction positive, on ne peut pas nier absolument sa présence lorsqu'elle est négative, car il est toujours possible que la réaction ne se soit pas effectuée.

En présence d'une tache à identifier, reposant sur un morceau d'étoffe, celui-ci est mis à macérer et avec la solution obtenue on procède comme nous l'avons indiqué plus haut. Si la tache de sang est sur un couteau ou un morceau de bois, il suffit d'en détacher quelques petites écailles de sang desséché et de les chauffer sur une lame dans de l'acide acétique glacial suffisamment longtemps pour faire dissoudre au moins une partie du sang, en suivant l'un des deux procédés de la méthode. Dans tous les cas la réaction de Teichmann nécessite une quantité de sang suffisante, la solution sanguine à identifier doit être colorée et les écailles ne doivent pas être trop infimes.

Néanmoins la réaction de Teichmann est assez sensible ; elle réussit avec des taches très petites. Certains auteurs affirment avoir eu des résultats positifs avec des solutions sanguines au cinq centième de milligramme. Avec des taches datant de cinq, six, sept et huit ans, nous avons obtenu des résultats positifs, mais les cristaux étaient rares et petits. De même avec du sang bouilli le résultat fut positif. En présence de sang putréfié la réaction ne s'effectue pas.

Malgré tous ses inconvénients, la plupart des médecins légistes préfèrent la réaction de Teichmann à toute autre méthode cristallographique, non seulement parce que, étant la plus ancienne, elle a fait ses preuves, mais aussi parce que cette réaction ne nécessite pas d'autre outillage qu'un microscope et de l'acide acétique glacial, facile à se procurer et à conserver.

Les manipulations de la méthode, tout en restant délicates et longues, sont très simples.

II. *Méthode de Strzyzowski.*

En face des difficultés et des incertitudes que présente la réaction de Teichmann, Strzyzowski proposa en 1902 une nouvelle réaction qui n'est pas plus simple, mais qui est certainement plus sensible.

Le réactif est le suivant:

acide acétique glacial .....1 c.c.
alcool à 95° .....1 c.c.
eau distillée .....1 c.c.
acide iodhydrique incolore de D:1,5,.....2 gouttes
(s'il est coloré en rouge) .....3 gouttes

Il faut mélanger le tout avec beaucoup de soin. On dépose sur une lame de verre une petite parcelle de substance suspecte complètement sèche, ou une goutte d'une solution à identifier qu'on évapore doucement. On la couvre d'une lamelle et l'on glisse quelques gouttes du dit réactif. On chauffe la préparation afin de la faire bouillir pendant au moins 10 à 20 secondes, pendant ce temps il est indispensable d'ajouter du réactif à la préparation. Les cristaux ainsi formés sont plus petits et plus foncés que ceux de Teichmann, ils sont de forme rhombique. Ce sont des cristaux d'iodhydrate d'hématine. La réaction est un peu plus rapide que celle de Teichmann.

Le réactif de Strzyzowski ne peut être conservé que pendant deux ou trois jours. Ceci constitue le plus grand défaut de la réaction et c'est pour cela que la méthode de Strzyzowski n'a pu détrôner complètement la classique réaction de Teichmann. En effet, en opérant avec le réactif de Strzyzowski datant de plus de deux ou trois jours on n'obtient qu'une poussière de cristaux, impossible à identifier. Avec un réactif plus ancien encore on n'obtient plus rien. Le réactif fraîchement préparé est clair, mais au bout de 24 heures il prend une coloration rouge qui va en s'in-

tensifiant, ce qui gêne l'examen microscopique en diminuant le contraste entre le fond de la préparation qui devient rouge-brun et les cristaux qui sont brun foncé. Il n'y a qu'un moyen d'éviter ces inconvénients, c'est de préparer le réactif au moment de s'en servir. Cependant, la préparation du réactif présente elle aussi un point délicat; c'est la difficulté qu'on a à se procurer de l'acide iodhydrique et surtout à le conserver. Frais, il est clair; au bout de vingt-quatre heures, il devient rouge, mais on peut encore l'employer. Au bout de deux jours, il est brun-foncé et il n'est plus utilisable.

Nous donnons ici un des procédés de fabrication rapide de cet acide que l'on devra préparer au moment de l'emploi. On dissout trente grammes d'iodure de potassium dans 25 c.c. d'eau, puis 27 gr. d'acide tartrique dans 25 c.c. d'eau. On mélange et on filtre. Il se produit une double décomposition entre l'acide tartrique et l'iodure de potassium en solution concentrée. Du bitartrate de potasse insoluble précipite et reste sur le filtre. On obtient ainsi 50 c.c. d'une solution d'acide iodhydrique de densité 1,5.

Il résulte donc que la préparation du réactif est assez longue et sous ce point la méthode de Teichmann est plus expéditive. Comme pour la réaction de Teichmann l'ébullition peut faire sauter la lamelle et rendre ainsi la préparation inutilisable. Les mêmes précautions sont à observer.

C'est par sa grande sensibilité que la réaction de Strzyzowski présente des avantages. Elle donne des résultats positifs avec du sang très vieux. Nous avons obtenu des cristaux, très petits il est vrai, avec des taches de sang datant de huit ans, avec du sang putréfié, avec du sang bouilli, avec des taches de sang mélangées à de la rouille.

Dervieux affirme avoir caractérisé le sang d'une momie de quatre mille ans, quand toutes les autres méthodes avaient échoué. Plusieurs auteurs ont obtenu des cristaux de Strzyzowski avec des quantités de sang excessivement minimes, de l'ordre de 5/1000 de milligramme.

Les cristaux de Strzyzowski, ainsi que les cristaux de Teichmann, se conservent longtemps et peuvent être présentés en préparation comme pièce à conviction.

Nous concluons que la méthode de Strzyzowski ne présente par rapport à celle de Teichmann qu'un seul avantage, celui de la sensibilité, mais que sous le rapport de la préparation du réactif et de sa conservation la réaction classique de Teichmann semble plus expéditive.

Nous ne parlerons pas des nombreuses modifications de la méthode de Stryzowski qui ont été préconisées; les améliorations qu'elles lui apportent étant le plus souvent insignifiantes. Citons pourtant celle de Gaude et de Oustinoff. Le premier préconise un réactif où l'acide iodhydrique est remplacé par de l'acide chlorhydrique et de l'iodure de potassium. Ce réactif est d'une très mauvaise conservation, mais ses composants isolément se conservent plus longtemps que l'acide iodhydrique, évitant la préparation extemporanée de ce dernier.

Quant au réactif proposé par Oustinoff, il contient de l'acide iodique à la place de l'acide iodhydrique et de la glycérine ou de la gomme arabique à la place de l'eau distillée. L'acide iodique se conserve en effet plus longtemps que l'acide iodhydrique, le réactif lui-même également, mais ce dernier présente l'inconvénient d'être bien moins sensible que le réactif de Strzyzowski.

III. *Méthode de Gabriel Bertrand.*

Le réactif que Gabriel Bertrand préconise pour l'identification microchimique du sang ne date que de 1931; il est par conséquent peu connu. Ce réactif a la composition suivante:

chlorure de magnésium cristallisé.....	1 gr.
eau distillée	1 gr.
glycérine à 30°	5 gr.
acide acétique glacial	20 gr.

On dissout le sel magnésien dans l'eau distillée, on ajoute le glycérol, puis l'acide acétique et l'on mélange. Le réactif est par-

faitement clair, il a une consistance légèrement sirupeuse et ne court pas sur la lame de verre comme l'acide acétique pur, ce qui constitue un de ses multiples avantages et non le moins important. Il est aussi moins volatil, son point d'ébullition étant plus élevé par le chlorure de magnésium et par la glycérine ce qui permet de porter la préparation à une température suffisamment haute sans toutefois arriver à l'ébullition.

On évite ainsi les inconvénients que celle-ci entraîne.

Grâce aux propriétés physiques de ces deux substances, il ne s'évapore pas à sec ; aussi le plus souvent une seule goutte de réactif est suffisante.

Enfin, il est d'une conservation parfaite. Nous avons expérimenté avec un réactif de Bertrand datant de sept mois, il était aussi clair qu'au moment de sa préparation et nous avons obtenu des résultats très nets et très rapides. Il se conserve dans un flacon muni d'un bouchon de liège et peut rester à la lumière du soleil sans perdre ses qualités.

On opère de la manière suivante : On dépose une goutte de réactif sur le résidu d'évaporation de la solution d'hémoglobine et l'on recouvre d'une lamelle. Ou bien, s'il s'agit d'identifier du sang desséché sur un support dont on puisse le détacher, on en prélève avec un scalpel une fine parcelle, on la met sur la lame porte-objets, on dépose une goutte de réactif et on recouvre d'une lamelle. La préparation est ensuite portée au-dessus d'une très petite flamme, comme celle de la veilleuse d'un brûleur à gaz et on chauffe à l'endroit où se trouve la substance à examiner. Pour ne pas faire éclater la lame de verre, (la lamelle n'éclate pratiquement jamais), on chauffe seulement quelques secondes en imprimant à la lame, maintenue horizontale, un petit mouvement circulaire et on apprécie la température de la partie chauffée en la posant un court instant sur la main. On chauffe encore quelques secondes, on tâte la lame et ainsi de suite jusqu'au moment où le contact ne peut plus être supporté. En examinant ensuite au microscope, on voit des cristanx très nets

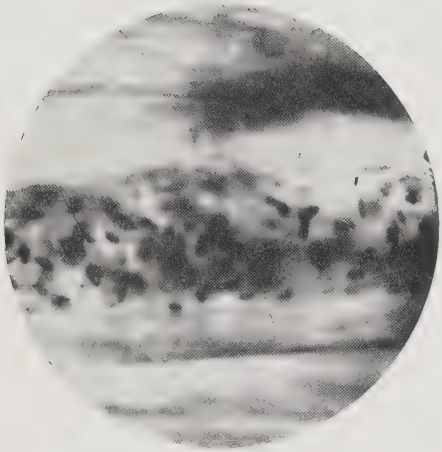


Fig. 1
Cristaux de G. BERTRAND (Microréaction)
Objectif: 9a Oculaire: 10 (Wetzlar)

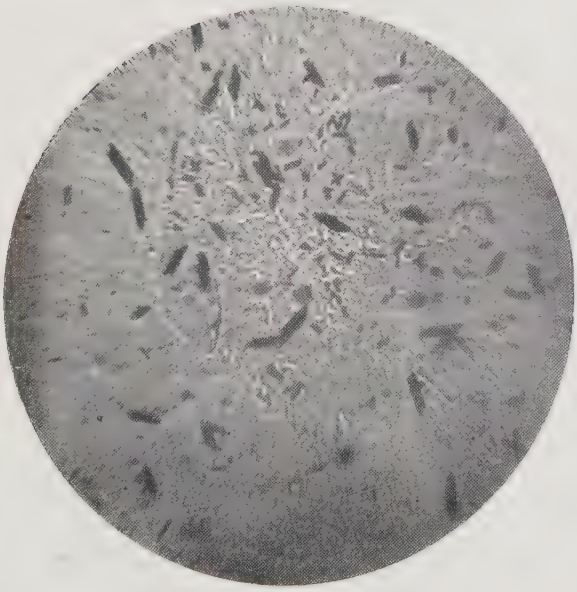


Fig. 2
Cristaux de G. BERTRAND
Objectif: 5 Oculaire: 2 (Nachet)

Les Editions Universitaires de Strasbourg.

d'hémine. Ils ont la forme caractéristique des cristaux de Teichmann. On peut augmenter le nombre des cristaux par de nouveaux chauffages. En présence de sang très vieux, ou en présence de trop petites écailles de sang, nous conseillons un chauffage plus prolongé. Il suffit d'une quantité extrêmement petite de sang pour réaliser la réaction.

Notre maître, le professeur CHAVIGNY, nous ayant demandé, à propos d'une affaire criminelle, d'identifier la présence du sang sur une tache faiblement colorée, reposant sur un morceau d'étoffe blanche, nous avons pratiqué à l'aide du réactif de Bertrand une microréaction. Nous avons détaché de l'étoffe un fil d'une longueur de 2 à 3 millimètres et d'un diamètre de 1/2 millimètre à peu près. Après avoir placé ce fil sur une lame de verre, nous l'avons effiloché le plus possible à l'aide de deux aiguilles lancéolées et avons pratiqué ensuite la réaction en suivant la technique indiquée. De toute la préparation, c'est seulement le long d'un seul filament d'effilochage excessivement menu que nous avons pu voir des cristaux d'hémine. Mais le résultat était concluant ainsi qu'on peut s'en rendre compte d'après la microphoto ci-après.

Nous avons réussi également avec des particules de sang desséché de l'ordre de 2/5 de millimètre de diamètre à peu près.

Avec du sang bouilli, avec du sang mélangé à de la rouille, nous avons obtenu très facilement des cristaux. Mais en présence de sang putréfié la réaction est nulle.

Gabriel Bertrand a eu des résultats tout-à-fait nets, dit-il, avec des quantités de sang de l'ordre de 1/2 millième de milligramme.

La sensibilité du réactif de Bertrand est donc très grande, beaucoup plus grande que celle de la réaction de Teichmann et à peu près aussi grande que celle de Strzyzowski.

Le mode d'emploi de la réaction est plus simple et plus rapide que celui de toute autre réaction cristallographique, parce qu'une seule goutte de réactif est suffisante et qu'on n'est pas obligé de porter à l'ébullition, ni de soutenir cette ébullition pen-

dant 20 à 30 secondes comme la réaction de Strzyzowski l'exige. En outre de la facilité et de la sûreté de son emploi, le réactif de Bertrand est d'une conservation parfaite et présente aussi l'avantage de fournir une préparation permanente.

La réaction de Bertrand ne demande aucun tour de main spécial et on peut la réussir dès la première fois. Elle ne demande pas non plus la longue préparation extemporanée du réactif, que nécessite la réaction de Strzyzowski. Elle est simple, rapide, expéditive et sûre.

Parmi les réactions cristallographiques, c'est sur la réaction de Bertrand que nous avons arrêté notre choix.

Méthodes spectroscopiques.

La méthode spectroscopique est la plus simple, la plus rapide et la plus certaine pour reconnaître du sang. L'inconvénient qu'elle présente est de nécessiter une assez grande quantité de sang, ce qui la rend dans bien des cas impraticable.

En effet, l'emploi du grand spectroscope exige une solution sanguine suffisamment concentrée, c'est-à-dire franchement colorée, équivalant à une solution de sang à 1 pour 100 à peu près. On admet qu'on a une concentration suffisante quand la solution à identifier présente une teinte qu'on désigne par l'expression de «fleur de pêcher». sous une épaisseur d'un centimètre.

On convient facilement qu'on ne peut pas obtenir des solutions aussi concentrées et d'un volume suffisant, avec des taches minuscules de sang. La solution sanguine obtenue doit être filtrée puis recueillie dans une cuve à faces parallèles, ou dans un tube à essai, qu'on pose devant la fente du spectroscope préalablement réglé. La mise au point de cet appareil est assez délicate.

Les recherches spectrales à l'aide du grand spectroscope nécessitant des quantités trop importantes de sang sont peu employées dans l'étude des taches, où l'on ne dispose le plus souvent que de petites quantités.

C'est pour cette raison que nous avons cru devoir passer rapidement sur cette question de spectroscopie médico-légale qui, du reste, est étudiée avec force détails dans presque tous les livres classiques de médecine légale.

Nous envisageons tout de suite la méthode microspectroscopique.

Méthode microspectroscopique.

Cette méthode est basée sur les mêmes principes que la spectroscopie à l'aide du grand spectroscope, nous n'insisterons pas.

En présence de toutes petites taches de sang où l'usage du grand spectroscope est impossible, la méthode microspectroscopique peut apporter les résultats les plus précis et les plus rapides. La technique est simple. Le microspectroscope est un petit spectroscope à vision directe que l'on adapte sur le microscope à la place de l'oculaire.

Le principe de la méthode consiste à obtenir le spectre de l'hémochromogène qui est de l'hématine réduite en solution alcaline; car les deux raies d'absorption de cette substance sont très caractéristiques et visibles avec une dilution sanguine de 1/16.000.

On opère de la manière suivante: Si la tache de sang se trouve sur un objet métallique ou sur un morceau de bois, on en prélève une fine parcelle que l'on dépose sur une lame de verre. On ajoute une goutte de soude caustique ou de l'ammoniaque pur qui ont la propriété de transformer l'oxyhémoglobine en hématine, si elle n'est pas déjà transformée par le vieillissement. A l'hématine en solution alcaline on ajoute un réducteur, de préférence l'hydrosulfite de soude, en petite quantité et on couvre le tout avec une lamelle. On obtient rapidement le dérivé de l'oxyhémoglobine dont on se propose de rechercher la présence, c'est-à-dire l'hématine réduite en solution alcaline, ou l'hémochromogène. Comme l'hydrosulfite de soude se dissout plus rapidement dans

l'ammoniaque que dans la soude, en employant le premier alcalin, l'obtention de l'hémochromogène sera plus rapide.

On porte ensuite la préparation sur la platine du microscope et on met au point en se servant pour commencer d'un objectif faible. Le microscope au point, on retire l'oculaire que l'on remplace par le petit spectroscope. Si la tache n'est pas du sang, on aperçoit un spectre ordinaire ne comprenant aucune bande d'absorption. Si, au contraire, la tache est constituée par du sang, on voit apparaître les deux bandes d'absorption de l'hémochromogène. La première plus foncée et plus nette que la seconde est située entre les raies D. et E., à peu près dans l'espace intermédiaire entre les deux bandes que produirait l'oxyhémoglobine. On la distingue de la bande de l'oxyhémoglobine à ce que celle-ci empiète sur le rouge, tandis que la première est séparée du rouge par une petite bande verte. La seconde bande d'absorption de l'hémochromogène est beaucoup moins intense et plus mince que la première. Elle est située au-delà de la raie E. Le plus souvent elle est trop faible pour être perçue.

En présence de sang reposant sur du linge blanc, une portion du linge taché sera découpée et placée sur une lame de verre. On ajoute ensuite une goutte de potasse caustique ou d'ammoniaque pur. Une petite quantité d'hydrosulfite de soude sera déposée sur la tache et on couvre avec une lamelle. En examinant au microscope quelques instants après, le spectre de l'hémochromogène apparaît de la façon la plus nette.

Si la tache siège sur une étoffe colorée, ou épaisse, c'est-à-dire opaque et ne laissant pas passer la lumière, on opère comme précédemment, ayant pris soin au préalable d'effilocher et de dissocier avec des aiguilles les fils du tissu qu'on a découpé et sur lequel repose la tache. On produit ainsi entre ces fils des espaces clairs à travers lesquels passe la lumière et que remplit le liquide de macération. On met au point pour un de ces espaces et on remplace ensuite l'oculaire par le microspectroscope. Le spectre de l'hémochromogène ne présente aucune cause d'erreur. Tout résultat positif apporte la certitude de la présence du sang.

Si le spectre de l'hémochromogène offre une bande d'absorption discontinue au petit grossissement, on peut, en mettant au point un endroit où la bande est apparente et en regardant au fort grossissement, percevoir une bande d'absorption plus nette et continue. En mettant bien au point, la deuxième bande d'absorption qui n'était pas visible au faible grossissement peut apparaître au fort grossissement.

Ajoutons qu'avec de toutes fines écailles de sang d'une tache desséchée sur une lame de couteau et mélangée à de la rouille, nous avons obtenu des résultats tout-à-fait probants en employant l'ammoniaque comme dissolvant et comme alcali et l'hydrosulfite de soude comme réducteur.

On ne doit jamais se servir de sulfhydrate d'ammoniaque comme réducteur, surtout quand la tache repose sur du fer ou quand elle contient de la rouille ou des traces de fer sous une forme quelconque. En effet, il se produit du sulfure de fer, la préparation prend une teinte qui varie du noir au brun-verdâtre et il est alors impossible de distinguer quoi que ce soit.

Nous avons pratiqué avec succès l'examen microspectroscopique sur des *empreintes de taches de sang*. Ce procédé est surtout à conseiller en présence des taches reposant sur du fer ou étant fortement mélangées à de la rouille. L'empreinte doit être faite à l'ammoniaque et non à l'eau distillée, et ceci pour deux raisons: l'ammoniaque dissout plus rapidement les taches de sang que l'eau et il ne dissout pas la rouille.

Sur l'empreinte effectuée, on découpe avec des ciseaux propres un petit bout de papier dans la partie la plus foncée, on le dépose sur une lame et on procède comme on ferait avec des parcelles de sang.

La méthode microspectroscopique est une méthode de certitude de la plus grande importance pour identifier de très petites quantités de sang. Elle est d'une grande sensibilité. Certains auteurs l'ont trouvée positive avec des solutions sanguines de 1/16.000.

Les résultats positifs qu'elle fournit sont rapides, très nets et d'une certitude absolue. En effet on n'a pas trouvé à cette méthode des causes d'erreur.

Pourtant devant des résultats négatifs, il faut être prudent et on ne devrait pas répondre : «La tache ne contient pas de sang», mais : «Nous n'avons pas pu caractériser le sang par la méthode microspectroscopique.»

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Les méthodes d'identification du sang en médecine légale se divisent en méthodes de probabilité et méthodes de certitude.

I. — Les méthodes de probabilité sont toutes basées sur le même principe ; ce sont des réactions colorantes du sang. Aucune de ces méthodes n'est spécifique du sang, mais leur spécificité relative est plus ou moins grande suivant la méthode.

Les unes provoquent des réactions analogues à celles du sang, avec des substances organiques diverses et avec certaines substances minérales.

D'autres ne provoquent de réaction positive qu'avec certaines substances organiques ; quelques-unes, seulement avec certaines substances minérales.

Toutes présentent des causes d'erreur. Leur spécificité est pourtant améliorée en suivant certaines précautions. Ainsi on élimine dans presque tous les cas les causes d'erreur provenant de la présence des substances organiques autres que le sang, en faisant bouillir la solution à examiner ou en lui ajoutant de l'acide acétique glacial suivant la méthode qu'on emploie. Les substances minérales, causes d'erreur, ne peuvent par contre pas être toutes éliminées, mais en tenant compte du laps de temps nécessaire à la réaction, qui varie suivant la méthode, connaissant exactement la nuance de la coloration que le sang produit en présence de tel ou tel réactif, on arrive à éliminer la plupart des causes d'erreur.

Néanmoins les résultats positifs fournis par les réactions de probabilité, n'apportent pas la certitude, mais seulement l'indication probable de la présence du sang. Aussi tout résultat posi-

tif obtenu par une de ces méthodes demande à être vérifié. Par contre leurs résultats négatifs sont certains et dispensent de toute recherche ultérieure inutile.

La grande utilité des méthodes de probabilité découle de leur extrême sensibilité. Ainsi comme moyen d'investigation des traces infimes de sang, impossibles à mettre en évidence par d'autres procédés, ces méthodes constituent les moyens les plus précieux. Elles sont rapides et expéditives. Nous avons résumé dans un tableau inclus dans la thèse, la synthèse des résultats que nous avons obtenus en éprouvant expérimentalement les principales réactions colorantes du sang.

II. — Les méthodes de certitude se divisent en:
a) méthodes cristallographiques,
b) méthodes spectroscopiques.

a) Les méthodes cristallographiques sont nombreuses et de valeur inégale. Les unes sont plus sensibles, d'autres présentent une technique longue et délicate, enfin d'autres utilisent des réactifs d'une mauvaise conservation et d'une préparation trop longue.

Parmi toutes ces méthodes, celle que l'expérimentation nous a montrée comme la meilleure sous presque tous les rapports, est la méthode cristallographique proposée par Gabriel BERTRAND. Conservation du réactif parfaite, technique facile et rapide, sensibilité très grande.

Par leurs résultats positifs, les méthodes cristallographiques apportent la certitude la plus absolue de la présence du sang. Leur résultat négatif n'a aucune valeur.

b) Les méthodes spectroscopiques et spécialement la méthode microspectroscopique est une méthode rapide, simple et très sensible. Les quantités de sang qu'elle exige pour fournir un résultat positif, sont infimes. Ses résultats positifs sont certains, ses résultats négatifs tout en n'étant pas certains, ont une plus grande valeur que ceux des méhodes cristallographiques.

Ainsi en combinant successivement les méthodes de probabilité et les méthodes de certitude dont la valeur probatoire est inverse, on peut aboutir pratiquement dans tous les cas à des résultats d'une certitude absolue, non seulement pour affirmer la présence du sang, mais aussi pour affirmer son absence complète.

Vu : Le Président de thèse :
CHAVIGNY

Vu : le Doyen :
Pr. MERKLEN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université :
J. DRESCH

BIBLIOGRAPHIE.

ATHANASOFF J.: Le diagnostic des taches de sang par les cristaux d'hémine. (*Montpellier* 1914).

BERTRAND Gabriel: Sur un réactif permettant l'obtention facile des cristaux d'hémine et leur montage à partir du sang. (*Bull. de l'Académie de Médecine,* 1931, Séance du 24 Novembre).

BALTHAZARD, LAMBERT: Réaction de Meyer, recherche du sang en médecine légale. (*Soc. de méd. lég. de France, Bull.,* Paris, 1910).

BALTHAZARD: Précis de médecine légale.

BENOIT A. L. A.: Contribution à l'étude du réactif phénolphtalique de Kastle-Meyer; son application à la recherche du sang, en clinique et en médecine légale. (*Thèse de Lille,* 1911).

BIERRY H. et B. GOUZON: Caractérisation des taches de sang par réaction spectrale. (*Bull. de l'Acad. de Médecine,* séance du 10 mai 1932).

BORDAS F.: Etude médico-légale de la réaction à la benzidine dans la détermination des taches de sang. (*Compt. rend. Acad. d. Sc.,* Paris, 1910).

— Considérations sur les réactifs employés pour la détermination des taches de sang en méd. légale. (*Compt. rend. Acad. d. Sc.;* Paris, 1911).

— La benzidine dans les recherches du sang. (*Soc. de Méd. légale de France, Bull.,* Paris, 1910).

CESTAN R. : La recherche du sang par les procédés de la benzidine et de phénophtaline. (*Arch. méd. de Toulouse,* 1901).

DOROLLE : Sur un cas de diagnostic médico-légal des taches de sang. (*Gazette hebdomadaire des sciences médicales,* Août 1927).

DOURIS R. : Guide pratique pour l'analyse du sang.

DERVIEUX F. et . LECLERCQ : Diagnostic des taches.

FAN LEUNG : Une nouvelle méthode de détermination de l'origine du sang par les cristaux de Strzyzowski. (*Revue internationale de criminalistique,* 1931).

FAUQUÉ M. : Etude de quelques modifications apportées au diagnostic médico-légal des taches de sang par le procédé de Teichmann. (*Toulouse. Thèse de Moutauban,* 1911).

FAYET Y. : Etude médico-légale du sang par les procédés de laboratoire et plus particulièrement par les réactions colorantes. (*Thèse de Toulouse,* 1910).

GAUDE G. : L'expertise des taches de sang. (*Revue Internationale de criminalistique,* 1931).

GOIFFON R. et J. WALTZ : Procédé pour rechercher et extraire l'hématoporphyrine des selles. (*Compt. Rend. hebdom. des séances et mémoires de la Soc. de biologie et ses filiales,* 1931).

HEGER-GILBERT et DELAET : Recherche à l'examen des taches de sang. (*Soc. méd. lég. belge,* 10 Octobre, 1929).

KOÏTCHEFF N. : Les réactions colorées du sang; leur valeur médico-légale. (*Thèse de Montpellier,* 1912).

MEDINGER Pierre : Contributions au diagnostic de traces minimes de sang. (*Revue Intern. de criminalistique,* 1931).

OUSTINOFF P. V. : La réaction de Strzyzowski sur le sang. (*Ann. de méd. lég.,* Juillet 1929).

PERRIN M. et THIRY G. : L'identification des taches de sang, procédés modernes. (*Paris-Médical*, 1912-13).

ROJAS N. et C. DANIEL : Cyto-diagnostic in situ des taches de sang. (*Ann. de méd. lég.*, 7 Février, 1927).

SIMONIN C. : Le diagnostic médico-légal d'une tache de sang. (*Strasbourg Médical*, 5 Juin 1929, N° 11).

SARDA et CAFFORT : Sur un nouveau procédé d'obtention des cristaux d'hémine. (*Académie des Sciences*, Tome CXLIII, 1906).

VIBERT Ch. : Précis de médecine légale.

Strasbourg 1933. — Imprimeries des Éditions Universitaires de Strasbourg.